

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**ROBERT CHAMBERS** UND **WILLIAM SEIFRIZ**  
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK** UND **FRIEDL WEBER**  
ROSTOCK GRAZ

BAND XLIV, HEFT 2  
MIT 80 TEXTABILDUNGEN  
ABGESCHLOSSEN AM 20. SEPTEMBER 1954



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
1954

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,  
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spekt, Zoologisches Institut,  
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5  
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemisches Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostensersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLIV. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Abhandlungen

Biebl, R., und Waldtraut Rossi-Pillhofer: Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand . . . . .	113
Kaja, H.: Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der <i>Anthocerotales</i> . . . . .	136
Hagström, B., and J. Runnström: The Effect of N-Ethylmaleimide on the Fertilization of the Sea Urchin Egg . . . . .	154
Johannes, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien. . . . .	165
Kenda, Griseldis: Eiweißspindeln in <i>Opuntia monacantha</i> f. <i>variegata</i> . . . . .	192
Diskus, A.: Vitalfärbestudien an Euglenaceen. . . . .	194
Luger, H.: Der Einfluß der Ascorbinsäure auf die Assimilation und Atmung höherer Pflanzen . . . . .	212
Düvel, D.: Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten . . . . .	239
Sponsler, O. L., und J. D. Bath: Some Micellar Components of <i>Physarum polycephalum</i> as Revealed by the Electron Microscope . . . . .	259

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite



# **Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand**

Von

**Richard Biebl und Waldtraut Rossi-Pillhofer**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 9 Textabbildungen

(Eingelangt am 12. März 1954)

## **Einleitung**

Die Erforschung der Resistenzeigenschaften der Pflanze gegenüber chemischen Einflüssen zählt heute mit zu den meist untersuchten Fragen der Pflanzenphysiologie. Mit dem Bekanntwerden der Wirkung kleinster Stoffmengen, seien es die für die Ernährung wichtigen Spurenelemente (Lit. b. Scharrer 1944, Bibliography 1948, 1951, 1955 u. a.) oder die für das Wachstum entscheidenden Wuchsstoffe (Lit. b. Linser 1951, Frohberger 1951, Blackmann 1952 u. a.), ergab sich die Notwendigkeit, die optimalen Mengen gegen größere, schädigende Dosen abzugrenzen. Dabei wurde vor allem die Wirkung der durch den Boden, durch Besprühen oder durch Injektionen verabreichten Stoffgaben auf verschiedenste physiologische Leistungen, wie Wachstum, Atmung, Assimilation, Chlorophyllbildung usw., untersucht.

Die Zellphysiologie benützte ihrerseits schon lange die verschiedene Resistenz pflanzlicher Protoplaste gegen äußere Einwirkungen, darunter auch gegen chemische Agenzien, für Fragen der protoplasmatischen Anatomie (Weber 1929, Reuter 1949) oder der vergleichenden Protoplasmatik (Höfler 1952, 1959). Im Bereich ökologisch orientierter Plasmaforschung zeigte es sich, daß zwischen Standortfaktoren und Resistenz gegen diese enge Beziehungen bestehen und daß den Pflanzen eines und desselben Standortes oft gemeinsame Züge in ihrer plasmatischen Resistenz zukommen (Biebl 1959). Vergleicht man jedoch die Resistenz der Pflanzen eines bestimmten Standortes gegen Stoffe oder Einflüsse, die an diesem keine Rolle spielen, so hat die Gemeinsamkeit des plasmatischen Verhaltens ein Ende

(Biebl 1952 a, b). Die „ökologische Resistenz“ gegen bestimmte Umweltfaktoren ist also für Pflanzen eines Biotops vielfach ähnlich, die „nicht umweltbezogenen Resistenzen“ können hingegen recht verschieden sein (Biebl 1949). Letztgenannte sind daher besonders geeignet, verschiedene pflanzliche Plasmasorten zu kennzeichnen (Biebl 1947 a, 1950 a).

Erfahrungen der letzten Dezennien lehrten, daß die Protoplasmen verschiedener Pflanzen nicht allein untereinander verschiedenartig sind, sondern daß sie auch alters- und jahreszeitlich bedingte Veränderungen erfahren können. Das gilt sowohl für die Permeabilität (Krassinsky 1929, Marklund 1936, Höfler 1937, Hofmeister 1938, Lenk 1953 u. a.) wie für den osmotischen Wert (Lidforss 1907, Ursprung und Blum 1911, Steiner 1939, Pisek 1950 u. a.) oder die Viskosität und die Kälteresistenz (Weber und Hohenegger 1923, Kessler 1935, Kessler und Ruhland 1938 u. a.). Zusammenfassende Darstellungen der Änderungen der Plasmeeigenschaften beim Altern pflanzlicher Zellen gaben Paech (1940) und Fischer (1950). Die Größe der Schwankungen ist bei den verschiedenen Pflanzen nicht gleich.

Sieht man die „nicht umweltbezogenen konstitutionellen Resistenzen“ als Ausdruck eines gegebenen Plasmazustandes, so ist zu erwarten, daß auch diese — in unserem Falle die chemischen Resistenzen — entwicklungsbedingte Veränderungen erfahren werden.

Schon in der ersten Untersuchung über die Plasmaresistenz gegen Zink, Bor und Mangan (Biebl 1947 a) konnte an einigen Moosen gezeigt werden, daß die Resistenz bei der einen Art während des ganzen Jahres gleich bleibt, bei einer anderen hingegen wechselt. Es wurde daher in bezug auf den in Frage stehenden Stoff zwischen „resistenzkonstanten“ und „resistenzveränderlichen“ Plasmen unterschieden.

Vorliegende Untersuchung betrifft die Veränderlichkeit der chemischen Resistenz der Blatt- oder Stengelepidermen verschiedener Blütenpflanzen im Laufe ihrer Entwicklung. Beobachtet wurde die Wirkung von Borsäure und von Zink-, Mangan- und zum Teil auch von Chromsulfat. Um den jahreszeitlichen Einfluß vom Einfluß des Alters unterscheiden zu können, wurden an einer Reihe von Objekten zur gleichen Jahreszeit verschieden alte Individuen bzw. Organe untersucht. Die zur Untersuchung bestimmten Kulturpflanzen wurden zu diesem Zweck mehrmals hintereinander angebaut. Die Mitteilungen stützen sich im wesentlichen auf die von W. Rossi in ihrer Dissertation (Wien 1951) niedergelegten Beobachtungen. Es sei daher an dieser Stelle von einer vollständigen Wiedergabe der Protokolle und der Einzelbeobachtungen abgesehen.

### Methodik

Epidermisschnitte der Versuchspflanzen wurden in weithalsigen, 50 cm<sup>3</sup> fassenden Fläschchen über 48 Stunden in die abgestuft konzentrierten Lösungen eingelegt und anschließend mikroskopisch auf ihren Lebenszustand

untersucht. Die Einwirkungsdauer von 48 Stunden hat sich in den vorangegangenen Arbeiten als hinreichend lange erwiesen. Nach dieser Zeit bleiben die erreichten Schädigungen meist annähernd konstant. Ein weiteres Übergreifen auf niedrigere Konzentrationen geht dann nur mehr allmählich oder oft überhaupt nicht mehr vor sich. Als Lebensreaktion diente Plasmolyse in 0,5—1,0 mol KCl. Kontrollschnitte wurden gleich lange in doppelt destilliertem Wasser gehalten.

Im allgemeinen wurden von Borsäure ( $H_3BO_3$ ),  $ZnSO_4$ ,  $MnSO_4$  und  $Cr_2(SO_4)_3$  3%ige Lösungen in doppelt dest.  $H_2O$  hergestellt und aus diesen 1, 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001%ige Verdünnungen bereitet. Um die Prozentangaben mit solchen in Mol-Werten vergleichen zu können, seien die Mol-Werte der 1%igen Lösungen bzw. die Prozentwerte einmolarer Lösungen unserer Versuchsstoffe angegeben:

1% $H_3BO_3$	= 0,16 Mol, 1 Mol = 6,2%
1% $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	= 0,054 „ 1 „ = 28,7%
1% $Cr_2(SO_4)_3 \cdot 6 H_2O$	= 0,020 „ 1 „ = 50,0%
1% $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	= 0,044 „ 1 „ = 22,3%

Jedes Objekt wurde im Verlauf seiner Entwicklung monatlich ein- bis zweimal untersucht. In den graphischen Darstellungen sind die jeweils noch vitalen Grenzkonzentrationen angegeben.

#### 1. Resistenz wildwachsender, wintergrüner Pflanzen in der Zeit von März 1949 bis April 1950

Um die Beobachtungen auch über den Winter fortführen zu können, wurden zu dieser ersten Versuchsreihe Pflanzen mit wintergrünen Blättern gewählt, und zwar *Anemone hepatica*, *Cyclamen europaeum* und *Hedera helix*. Untersucht wurde die Epidermis der Blattunterseite und des Blattstieles, bei *Hedera* von Sonnen- und Schattenblättern. In jedem Versuch wurden vier Schnitte beobachtet.

Der Zeitpunkt der Blattentfaltung fällt bei den drei Pflanzen nicht in denselben Monat. Bei *Anemone hepatica* beginnt die Beblätterung durchschnittlich im April und bleibt auf kurze Zeit beschränkt, während die Blätter des Vorjahres allmählich absterben. Bei *Cyclamen europaeum* finden sich besonders im Juli junge Blätter, während die alten Blätter, die den Winter überdauert haben, bis Oktober erhalten bleiben. *Hedera helix* schließlich setzt mit der Neubeleblätterung im allgemeinen im April ein, wobei die Blätter häufig im selben Jahr nicht mehr ihre volle Größe erreichen. Man kann bei *Hedera* bis zu einem gewissen Grad aus dem Aussehen der Blätter auf ihr Alter schließen. Sie werden größer, dunkler grün, ledriger und verlieren den feinen, an der Unterseite ganz junger Blätter vorhandenen Flaum. Die Epidermen der Unterseite überwinternder Blätter sind meist anthokyanhaltig. Sonnen- und Schattenblätter unterscheiden sich

zudem wesentlich durch ihre Gestalt. Die Sonnenblätter sind oft fast eiförmig, größer und heller grün.

a) *Anemone hepatica*

Tab. 1 gibt ein Beispiel der Protokollführung und zeigt gleichzeitig das untereinander meist sehr gut übereinstimmende Resistenzverhalten der vier Parallelschnitte. Festgehalten sind in diesem Beispiel die Resistenz-

Tab. 1. *Anemone hepatica*, Resistenz verschieden alter Blätter gegen Borsäure, Zn-, Cr- und Mn-sulfat in der Zeit von März bis Juli. (4 = alles lebend, 3 = mehr als die Hälfte lebend, 2 = ungefähr die Hälfte lebend, 1 = einige Zellen lebend, 0 = alles tot. In den Kurvendarstellungen wurde ein Schnitt als „lebend“ bezeichnet, wenn alle oder zumindest fast alle Zellen lebend waren.)

%	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	MnSO <sub>4</sub>	%	MnSO <sub>4</sub>
17. 3. 49, Blatt vom Vorjahr						
3	0000	0000	0000	4444	20	4444
1	0000	0000	0000	4444	15	4444
0,1	4444	0000	0000	4443	10	4443
0,01	4444	0000	0000	4444	8	4444
0,001	4444	4444	0000	4444	5	4433
0,0001	4444	4444	3322	4444	4	4444
3. 4. 49, Blatt vom Vorjahr						
3	0000	2211	0000	4442	20	0000
1	4322	1111	0000	4444	15	3322
0,1	3322	0000	0000	4444	10	4444
0,01	4433	3222	0000	4444	8	4331
0,001	4444	4444	0000	4444	5	2211
0,0001	4444	4444	0000	4444	4	2211
4. 5. 49, Blatt vom Vorjahr						
3	0000	3211	0000	4422	20	1100
1	3311	2100	0000	4444	15	1100
0,1	4443	2100	0000	4444	10	3322
0,01	4444	1100	0000	4322	8	3211
0,001	4444	4332	2000	4432	5	3322
0,0001	4444	4422	2100	4420	4	4444
4. 5. 49, Frühlingsblatt 1949						
3	0000	0000	0000	0000		
1	4444	0000	0000	0000		
0,1	4444	0000	0000	0000		
0,01	4444	0000	0000	0000		
0,001	4444	0000	0000	0000		
0,0001	4444	4000	2200	4443		
6. 7. 49, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	0000		
1	0000	0000	0000	0000		
0,1	4444	0000	0000	0000		
0,01	4444	4200	0000	0000		
0,001	4444	4444	0000	4444		
0,0001	4444	4444	0000	4444		

%	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	MnSO <sub>4</sub>	%	MnSO <sub>4</sub>
25. 8. 49, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	4444	20	0000
1	4332	0000	0000	4444	15	0000
0,1	4444	0000	0000	4442	10	0000
0,01	4444	4300	0000	4444		
0,001	4444	4444	0000	4444	5	4444
0,0001	4444	4444	3322	4444	4	4444
3. 10. 49, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	4444	20	0000
1	4444	0000	0000	4444	15	1100
0,1	4444	0000	0000	0000	10	4444
0,01	4444	2211	0000	4444	8	4433
0,001	4444	4444	3322	4444	5	4444
0,0001	4444	4444	4444	4444	4	4444
14. 12. 49, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	4444	20	0000
1	4444	0000	0000	4444	15	0000
0,1	4444	0000	0000	4444	10	4444
0,01	4444	3322	0000	4444	8	4444
0,001	4444	4333	4444	4444	5	4444
0,0001	4444	4444	4444	4444	4	4444
25. 2. 50, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	4444		
1	4444	0000	0000	4444	15	1100
0,1	4444	0000	0000	4444	10	1111
0,01	4444	1100	0000	4444	8	4433
0,001	4444	4444	4444	4444	5	4444
0,0001	4444	4444	4444	4444	4	4444
26. 4. 50, Blatt von 1949						
3	0000	0000	0000	4322	20	0000
1	0000	0000	0000	3322	15	2222
0,1	4443	0000	0000	3332	10	2222
0,01	4444	2211	0000	4444	8	3222
0,001	4444	2211	3231	4444	5	3333
0,0001	4444	2211	3321	4444	4	4322
26. 4. 50, Frühljahrsblatt 1950						
3	0000	0000	0000	0000		
1	0000	0000	0000	0000		
0,1	4444	0000	0000	0000		
0,01	4443	0000	0000	0000		
0,001	4444	2211	2221	2200		
0,0001	4444	3222	4444	4444		

veränderungen der Epidermiszellen der Blattunterseite verschieden alter Blätter von *Anemone hepatica*. Die hohe Manganresistenz verlangte die Verwendung von 4, 5, 8, 10, 15 und 20% MnSO<sub>4</sub>.

In gleicher Weise wie in Tab. 1 von März bis Juli gezeigt, wurden diese



Versuche auch in den folgenden Monaten bis zum März des nächsten Jahres fortgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 1 kurvenmäßig dargestellt.

Die auffallendste Kurve in Abb. 1 ist die der Manganresistenz. Diese ist bei den jüngsten, frisch entfalteten Blättchen im Mai am niedrigsten (0,0001%  $\text{MnSO}_4$  wirkt noch tödlich!), steigt im Juli schon an und erreicht im August eine Höhe von 5%, die bis November sogar auf 15% hinaufgeht. Dann sinkt sie wieder etwas ab, aber nicht unter 8%. Die Tatsache, daß alte überwinterte Blätter des Vorjahres im Mai, zur gleichen Zeit, da die jüngsten Blätter die große Manganempfindlichkeit aufweisen, noch in einer 20%igen  $\text{MnSO}_4$ -Lösung leben und die jüngsten Blätter des folgenden Jahres, zur Zeit, da die nunmehr überwinterten Blätter des Hauptversuchsjahres eine Resistenz von 8% zeigen, wiederum bis zu 0,0001% herunter geschädigt werden, läßt klar erkennen, daß hier die verschiedene Resistenz — unabhängig von der Jahreszeit — vom Alter der Zelle bedingt ist.

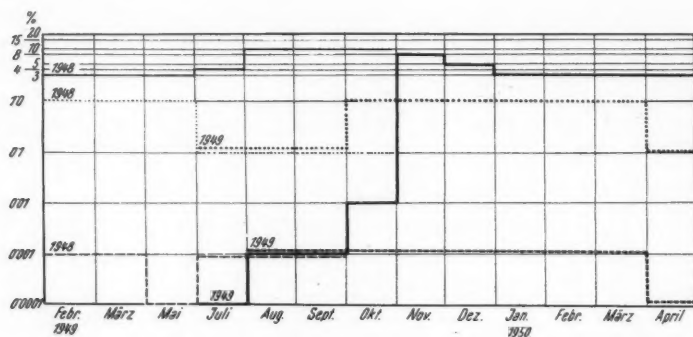


Abb. 1. *Anemone hepatica*, Epidermis der Blattunterseite. Jahresgang der Resistenzen 1949/50.

..... =  $\text{ZnSO}_4$ , ..... =  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , — =  $\text{MnSO}_4$ . 1948 = überwinterte Blätter vom Vorjahr, 1949 = Blätter des Hauptversuchsjahres, 1950 = ganz junge Blätter des dem Hauptversuchsjahr nachfolgenden Jahres.

Nicht so klar ist dies bei den Resistenzen gegen Borsäure und Zinksulfat. Hier zeigen nämlich sowohl die ältesten überwinterten Blätter des Vorjahres wie die jüngsten in den Monaten April und Mai eine gleichmäßig niedrigere Resistenz als die vollentwickelten Blätter in den Monaten August bis März. Man könnte daher an jahreszeitlich bedingte Resistenzverschiedenheiten denken. Zieht man aber die große Verschiedenheit der Umweltverhältnisse in den Monaten August bis Februar in Betracht, so neigt man doch dazu, auch hier die Resistenzunterschiede dem verschiedenen Blattalter zuzuschreiben. Nur würde in diesen Fällen nicht wie beim Mangan die hohe Resistenz der vollgewachsenen Blätter im Alter erhalten bleiben, sondern wiederum etwas absinken.

b) *Cyclamen europaeum*

Ein ganz ähnliches Bild der Resistenzänderungen und auch des Verhältnisses der Giftigkeit von Bor, Zink und Mangan zueinander zeigen die Epidermiszellen von *Cyclamen europaeum*. Auch hier war es möglich, die Resistenz überwinterter Blätter des Vorjahres mit den sich im Beobachtungsjahr entwickelnden nebeneinander zu vergleichenden (Abb. 2).

Die Borresistenz ist wie bei *Anemone hepatica* höher als die Zinkresistenz. Beide Resistenzkurven zeigen auch den gleichen jahreszeitlichen Verlauf wie bei *Anemone*. Die Epidermen der jüngsten und ältesten Blätter sind empfindlicher als die der vollentwickelten Blätter. Gemessen an den großen Unterschieden zwischen jungen und alten Blättern in der Manganresistenz sind die Schwankungen aber geringfügig.

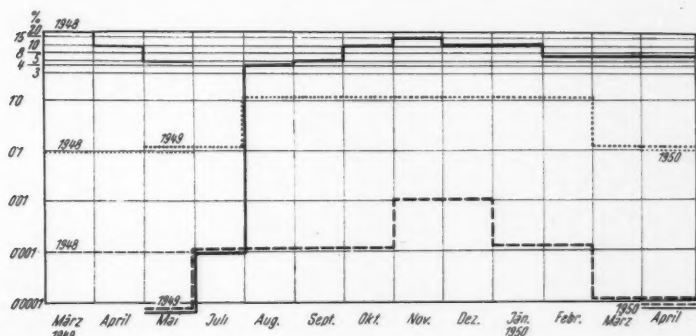


Abb. 2. *Cyclamen europaeum*, Epidermis der Blattunterseite. Jahresgang der Resistenzen 1949/50.

----- = ZnSO<sub>4</sub>, ..... = H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, — = MnSO<sub>4</sub>.

c) *Hedera helix*, Schattenblatt

Hatten wir bei den beiden vorgenannten Pflanzen — abgesehen von der geringen Resistenzsteigerung bei den vollentwickelten Blättern — gegen Bor und Zink annähernd Resistenzkonstanz und gegen Mangan starke Resistenzveränderlichkeit, so finden wir in der unteren Epidermis der Schattenblätter von *Hedera helix* ein Objekt, bei dem sich nur die Borresistenz in allen Altersstufen annähernd konstant verhält. Die Zinkresistenz erfährt hingegen, ebenso wie auch wieder die Manganresistenz, mit zunehmendem Alter der Zellen eine starke Steigerung von 0,0001% bis auf über 10% ZnSO<sub>4</sub>. Die Unabhängigkeit von den jahreszeitlichen Außenfaktoren geht wieder besonders schön aus der gleichzeitigen hohen Resistenz alter, überwinterter (1948) und der niederen Resistenz frisch entfalteter, junger Blätter hervor (Abb. 3).

d) *Hedera helix*, Sonnenblätter

Von diesem Objekt konnten gleichzeitig mehr als zwei verschiedene Altersstufen geprüft werden. In guter Übereinstimmung mit den Schattenblättern zeigte sich in den ersten Monaten der Blattentwicklung ein starkes Ansteigen der Resistenzen gegen Zink- und Mangansulfat. Die Spanne zwischen jüngsten und ältesten Blättchen lag im Oktober zwischen 0,0001% und 3% (höhere Konzentrationen wurden nicht geprüft!)  $\text{ZnSO}_4$ , bzw. 0,0001% und 15%  $\text{MnSO}_4$ . Verschiedenes Verhalten zeigten die Schatten- und Sonnenblätter von *Hedera helix* in der Resistenz gegen Borsäure bei jungen Blättchen: Die Lichtform war häufig empfindlicher. Die Resistenz-

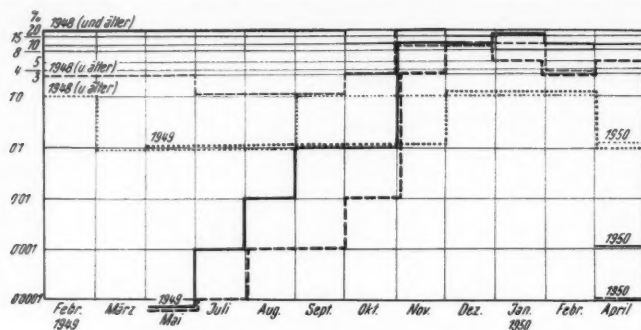


Abb. 5. *Hedera helix*. Schattenblatt. Epidermis der Blattunterseite. Jahresgang der Resistenzen 1949/50.

- - - - - =  $\text{ZnSO}_4$ , . . . . =  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , — =  $\text{MnSO}_4$ .

grenze junger Lichtblättchen lag manchmal schon bei 0,001%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , während die Epidermen junger Schattenblättchen durchwegs noch in 0,1% lebten.

## 2. Resistenz einiger Kulturpflanzen im Laufe ihrer Entwicklung

Die Pflanzen wurden im Versuchsgarten des Pflanzenphysiologischen Instituts im Wiener Augarten gezogen. Um die Faktoren Jahreszeit und Entwicklungsalter voneinander trennen zu können, wurden einzelne der Versuchspflanzen in Abständen von ein bis drei Monaten dreimal hintereinander angebaut. Dadurch standen für die Untersuchungen jeweils gleichzeitig verschieden alte Pflanzen zur Verfügung.

Für die ersten Versuche wurden Epidermen der Hypokotyle oder der Kotyledonenstiele, späterhin Epidermen der Stiele der größten Blätter verwendet.

Der leichteren Darstellbarkeit wegen sollen in den folgenden Kurven nur die Resistenzen der verschieden alten Blattstielepidermen wiedergegeben werden. Auf die Resistenzverhältnisse des Hypokotyls wird nur beschreibend hingewiesen werden.

a) *Raphanus sativus* L. f. *albus* D. C., Münchner Bierrettich, weiß

Die Resistenzen der Blattstielepidermen gegen Borsäure, Zink- und Mangansulfat (Abb. 4) änderten sich unter dem Einfluß des Alters und zum Teil wohl auch unter dem der Jahreszeit. Im allgemeinen stieg die Resistenz der Epidermiszellen von Hypokotyl, Kotyledonenstiel und Blattstiel mit dem Alter der Pflanzen an. Die Resistenzen der Hypokotyle gegen Mangan lagen wesentlich, die der Kotyledonenstiele um ein geringes höher als die junger Blattstiele.

Die Resistenz gegen Mangansulfat lag schon bei jungen Blattstielepidermen im Vergleich zu anderen Pflanzen hoch. Die Lebensgrenze gleich

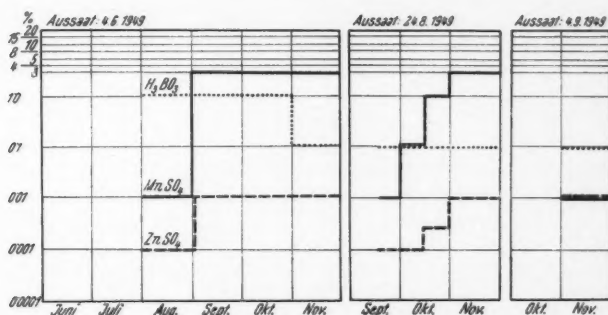


Abb. 4. *Raphanus sativus* L. f. *albus*, D. C., Münchner Bierrettich, weiß. Blattstielepidermis. Resistenzänderungen im Laufe der Entwicklung.

..... =  $ZnSO_4$ , ..... =  $H_3BO_3$ , — =  $MnSO_4$ .

junger Blattstielepidermen lag, unabhängig von der Jahreszeit, in allen drei Versuchen (August, September, November) bei 0,01% und stieg bis zu einem bestimmten Entwicklungszustand auf 3% an. Dieser Zustand war bei der ersten Aussaat im September, bei der zweiten im November erreicht. Eine im Juni untersuchte alte Pflanze hatte kurz vor dem Blühen gleichfalls ihre Resistenzgrenze bei 3%.

Bemerkenswert ist, daß bei Pflanzen mittleren Alters Konzentrationen von 0,1 und 1%  $MnSO_4$  häufig schädlicher wirkten als 3%ige Lösungen, während die Epidermen alter Pflanzen in allen diesen Konzentrationen am Leben bleiben.

Für Zinksulfat ergab sich folgendes Bild der Resistenz: Hypokotyle hatten nur im Juni ihre Lebensgrenze bei 0,0001%  $ZnSO_4$ , im Juli, September und Oktober aber bei 0,001% und im November sogar erst bei 0,01%. Parallel dazu lag die Lebensgrenze der Blattstielepidermen im August bei 0,001% und im November für die verschiedenen alten Blätter aller drei Versuche einheitlich bei 0,01%. Es scheinen demnach hier engere Beziehungen zwischen Resistenz und Jahreszeit zu bestehen als zwischen Resistenz und Alter.

In der Resistenz gegen Borsäure ließen sich keine besonderen Beziehungen zu Jahreszeit oder Alter feststellen. Die Resistenz war in den verschiedenen Altersstufen annähernd konstant. Die Lebensgrenzen lagen bei 0,1 oder 1%  $H_3BO_3$ .

b) *Brassica napa* var. *Rapa* (L.) Thellung, Weiße Rübe, Turnips

Es wurden zwei Aussaaten am 4. Juni und am 24. August gemacht und ab Juli bzw. ab Mitte September laufend untersucht. Die Resistenzen der Blattstielepidermen gegen Borsäure, Zink- und Mangansulfat änderten sich

hier wiederum deutlich mit dem Alter der Blätter, unabhängig von der Jahreszeit (Abb. 5).

Die Lebensgrenze für Zinksulfat lag bei den jüngsten Blättern im Juli und Oktober bei 0,001% und stieg bei der Aussaat im Juli bis November auf 0,1%, bei der Aussaat im Oktober bis November auf 0,01% an.

Die Resistenz gegen Mangansulfat zeigt gleiche Abhängigkeit vom Alter und Unabhängigkeit von der Jahreszeit. Die jüngsten Blättchen der ersten

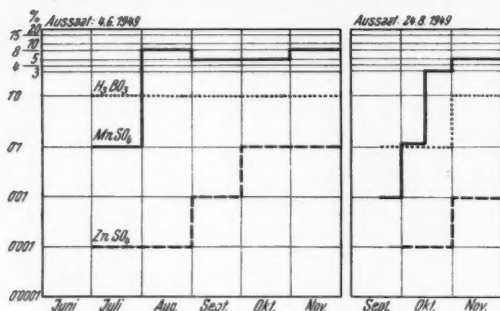


Abb. 5. *Brassica napa* var. *Rapa*, weiße Rübe. Blattstielepidermis. Resistenzen im Laufe der Entwicklung.

----- =  $ZnSO_4$ , ..... =  $H_3BO_3$ ,  $MnSO_4$ ,  
—— =  $MnSO_4$ .

Aussaat haben im Juli ihre Lebensgrenze in 0,1%, die im August bereits auf 8% hinaufschnellt. Diese hohe Resistenz bleibt bis November mehr oder weniger gleichmäßig erhalten. Die jüngsten Blätter der zweiten Aussaat haben im September wieder eine niedrigere Resistenz (0,01%), die aber gleichfalls innerhalb eines Monats auf 3 und im nächsten Monat auf 4%  $MnSO_4$  ansteigt. Wie beim Rettich finden wir auch hier gelegentlich bei 0,1–1%  $MnSO_4$  eine große Anzahl abgestorbener Zellen, während in 3%  $MnSO_4$  wiederum alle Zellen leben.

Die Resistenzgrenze gegen Borsäure lag im allgemeinen in jeder Altersstufe bei 1%, nur beim jungen Blattstiel der zweiten Aussaat schon bei 0,1%. Hier stieg sie erst später auf 1% an.

c) *Brassica oleracea* var. *gongylodes*, Kohlrabi, blauer Speck

Die Resistenzen gegen Zink- und Mangansulfat stiegen wiederum mit dem Alter, unabhängig von der Jahreszeit, stark an, die gegen Borsäure lag hingegen bei allen untersuchten Blattstielepidermen, wie auch bei den Hypokotylen, unabhängig von Alter und Jahreszeit gleichmäßig bei 1% (Abb. 6).



d) *Daucus carota*, Möhre, gelber Riese, Champion

Die Resistenzverschiedenheiten junger und alter Blätter sind bei der Möhre geringer als bei den bisher besprochenen Objekten. Die Widerstandsfähigkeit gegen Mangan- und Zinksulfat nimmt aber gleichfalls mit dem Alter etwas zu. Gegen Borsäure sank die Resistenz im August und September von 1% auf 0,1%, um Anfang Oktober wieder auf 1% Borsäure anzusteigen (Abb. 7).

e) *Solanum tuberosum*,  
Kartoffel, Olympia

Die ersten Untersuchungen wurden an Kartoffelpflanzen durchgeführt, die im Mai im ungedüngten Boden gelegt wurden. Diese Pflanzen waren schon bei der ersten Untersuchung voll entwickelt und konnten im August nicht mehr verwendet werden.

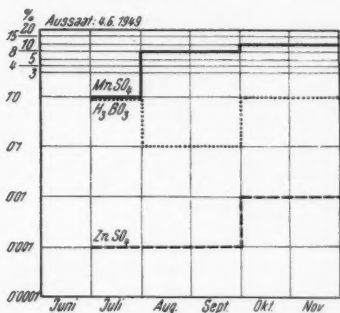


Abb. 7. *Daucus carota*, Möhre. Blattstielepidermis. Resistenzen im Laufe der Entwicklung.  
----- = ZnSO<sub>4</sub>, ..... = H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  
— = MnSO<sub>4</sub>.

zeigen demgegenüber die Epidermen der Blattstiele während der gesamten Versuchsdauer unverändert Resistenzkonstanz. Die Zinkresistenz beginnt auf 0,01% und sinkt in den alten Blättern im Oktober bis auf 0,0001% ab.

Ein Unterschied verschieden alter Blätter ein und derselben Kartoffelstaude ist kaum merkbar, mit Ausnahme bei der letzten Resistenzbestimmung.

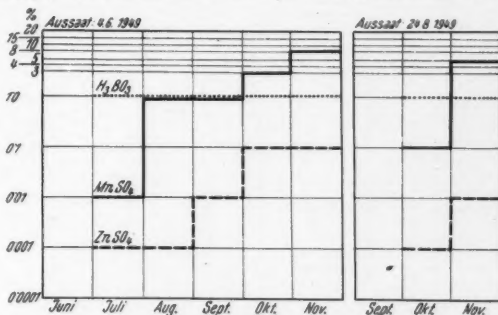


Abb. 6. *Brassica oleracea* var. gongylodes, Kohlrabi. Blattstielepidermis. Resistenzen im Laufe der Entwicklung.  
----- = ZnSO<sub>4</sub>, ..... = H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, — = MnSO<sub>4</sub>.

Eine zweite Serie wurde im Juni gelegt und im Jugendstadium (5 cm hoch) erstmals geprüft. Bei der letzten Untersuchung im Oktober waren diese Pflanzen schon kurz vor dem Abtrocknen (Abb. 8).

Die hohe Manganresistenz (3–10%) junger und voll entwickelter Blätter steht in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Biebl 1950 b). Sie fällt im Gegensatz zu den bisher besprochenen Objekten bei den ältesten Blättern im Oktober von 3,0 auf 0,1% ab. Gegen Borsäure

mung im Oktober, wo die älteren, vor dem Eintrocknen stehenden Sprosse den in Abb. 8 wiedergegebenen Resistenzschwund gegen Mangan- und Zinksulfat erleiden, während die Blattstielepidermen der jüngsten Sprosse

gleichzeitig ihre Lebensgrenzen noch in 3%  $\text{MnSO}_4$  und 0,001%  $\text{ZnSO}_4$  hatten.

f) *Solanum lycopersicum*, Tomate,  
Bonner Beste

Die Untersuchungen an Tomaten begannen erst nach dem Verpflanzen, also am endgültigen Standort. Beobachtungen an ganz jungen Pflanzen liegen daher nicht vor. Die Blattstielepidermen zeigten in den Monaten Juni bis Oktober gegen Borsäure und Zinksulfat eine vollkommen gleichbleibende, gegen Mangansulfat eine nur unwesentlich schwankende Resistenz. Gleichzeitig untersuchte Blätter derselben Staude ergaben gegen Borsäure und Zinksulfat die gleichen Resistenzgrenzen, nämlich

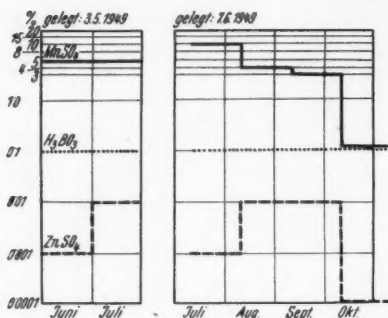


Abb. 8. *Solanum tuberosum*, Kartoffel, Olympia. Blattstielepidermis. Resistenzen im Laufe der Entwicklung.

..... =  $\text{ZnSO}_4$ , ..... =  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
—— =  $\text{MnSO}_4$ .

gegen  $\text{H}_3\text{BO}_3$  bei 0,1% und gegen  $\text{ZnSO}_4$  bei 0,001%. Gegen Mangansulfat lag die Resistenz der jungen Blätter bei 3%, bei den älteren dagegen bei 5–8%. Sie war also bei den jungen Blättern etwas geringer (Abb. 9).

### 3. Resistenz verschieden alter Sprosse einiger Wildpflanzen

Es wurde an sieben verschiedenen Arten die Resistenz der Stengelepidermen gegen Borsäure, Mangan-, Zink- und Chromsulfat in der Zeit von Juni bis Oktober in Abständen von je 4 Wochen untersucht, und zwar gleichzeitig die Resistenz von jüngeren und älteren Sprossen desselben Individuums. Versuchspflanzen waren die Labiaten *Salvia pratense*, *Salvia glutinosa*, *Salvia verticillata* und *Ballota nigra*, ferner die Caryophyllaceae *Saponaria officinalis*, die Liliaceae *Convallaria majalis* und die Vitaceae *Vitis vulpina*.

Verschiedenes Verhalten der Epidermen alter und jüngerer Sprosse derselben Pflanze wurde nur bei *Salvia verticillata* und *Ballota nigra* gegen  $\text{MnSO}_4$  festgestellt, und zwar waren bei der *Salvia* die jüngeren Sprosse

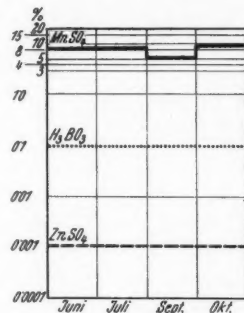


Abb. 9. *Solanum lycopersicum*, Tomate, Bonner Beste, Blattstielepidermis. Resistenzen im Laufe der Entwicklung.

..... =  $\text{ZnSO}_4$ , ..... =  
=  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , — =  $\text{MnSO}_4$ .

manganresistenter als die älteren, bei *Ballota* hingegen die jüngeren manganempfindlicher.

Tab. 2 gibt eine Übersicht des Schwankungsbereiches der Resistenz gegen die vier verwendeten Stoffe in den Monaten Juni bis Oktober 1949.

Tab. 2. Schwankungsbereich der Resistenz einiger Wildpflanzen in den Monaten Juni bis Oktober (bei *Vitis vulpina* a) = alter Trieb, b) = junge Triebspitze).

Voll erwachsene Pflanzen (Stengelepidermen)	Schwankungsbereich der Resistenz in den Monaten Juni—Oktober			
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub>	Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
<i>Salvia pratensis</i>	1—1%	0,001—0,01%	4—20%	0,0001—0,001%
<i>Salvia glutinosa</i>	0,1—0,1%	0,001—0,01%	8—15%	0,001 —0,001%
<i>Salvia verticillata</i>	0,1—0,1%	0,001—0,001%	0,01—15%	0,001 —0,0001%
<i>Ballota nigra</i>	1—0,1—1%	0,001—0,001%	3—20%	0,001 —0,0001%
<i>Saponaria officinalis</i>	1—0,1—1%	0,001—0,001%	10—20%	0,001 —0,001%
<i>Convallaria majalis</i>	1—0,1%	0,01 —0,01%	8—10%	0,001 —0,001%
<i>Vitis vulpina</i>	0,1—0,1%	0,001—0,001%	a) 0,01—1—0,01% b) 0,01—3—0,01%	0,001 —0,001%

Die Resistenz gegen Borsäure ist im Verlauf der Beobachtungsmomente konstant bei *Salvia pratense*, *Salvia glutinosa*, *Salvia verticillata* und *Vitis vulpina*. Bei *Ballota nigra* finden wir ein leichtes Absinken der Resistenz in den Monaten Juli bis September, bei *Saponaria* in den Monaten Juli und August. Dann steigt die Resistenz wieder auf den Ausgangswert. Bei *Convallaria* (Blattscheiden) schließlich sehen wir ab Ende Juli ein bleibendes Absinken von 1,0 auf 0,1% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Die Resistenz gegen Zinksulfat ist in den Monaten Juni bis Oktober konstant bei *Salvia verticillata*, *Ballota nigra*, *Saponaria officinalis*, *Convallaria majalis* und *Vitis vulpina*. Bei *Salvia pratensis* und *Salvia glutinosa* steigt sie im Juli von 0,001 auf 0,01% an, sinkt aber bei *Salvia pratensis* in den nächsten Monaten wieder auf 0,001% ab. Bemerkenswert ist die verhältnismäßig hohe, konstante Zinkresistenz (0,01% ZnSO<sub>4</sub>) der Epidermen der Blattscheiden von *Convallaria majalis*, die von anderen Pflanzen nur selten oder nur vorübergehend erreicht wird. Gleichzeitig durchgeführte Bestimmungen an äußeren, inneren und chlorophyllfreien inneren Blattscheiden von *Convallaria majalis* ergaben gleiche Resistenzgrenzen.

Auffallend sind hingegen die großen Resistenzschwankungen gegen Mangansulfat. Im allgemeinen ist die Resistenz sehr groß. Vitale Plasmolysen von *Salvia glutinosa* und *Salvia verticillata* in 15%, von *Saponaria officinalis* in 15 und 20% sowie Plasmolysen, die allerdings zum Tode führen, in 15 und 20% MnSO<sub>4</sub> bei *Convallaria majalis* zeigen — ähnlich wie dies auch für die sehr manganresistenten Moose gilt (Biebl 1949) —, daß nicht etwa die Zellmembran dem Mangansulfat den Durchtritt verwehrt, sondern daß die Lösung tatsächlich den Protoplasten umspült. Wie weit diese hohen Manganresistenzen etwa auf einer erschwerten Wegsam-

keit eines besonders widerstandsfähigen Plasmalemmas und damit einer Verhinderung einer Intrabilität (vgl. Höfler 1951) beruht, wurde noch nicht untersucht.

Während die meisten dieser Wildpflanzen in jungen und alten Sproßepidermen schon im Juni eine hohe Manganresistenz von 3 bis 8%  $\text{MnSO}_4$  zeigten, die in den nächsten Monaten noch bis auf 10–20% anstieg, fielen *Salvia verticillata* und *Vitis vulpina* durch zeitweise weitaus größere Manganempfindlichkeit auf. *Salvia verticillata* hatte im Juni eine Lebensgrenze bei nur 0,01%  $\text{MnSO}_4$ , die sich allerdings im Juli auf 1%, im September auf 8% und im Oktober auf 15% erhöhte. Es ist dies ein Ansteigen, wie es im vorigen ähnlich z. B. bei *Hedera helix* und *Cyclamen europaeum* zu sehen war. Bei *Vitis vulpina* lag die Resistenzgrenze im Juni gleichfalls bei 0,01%  $\text{MnSO}_4$ , stieg im Juli bei einem dunkelroten alten Trieb auf 1%, bei einer jungen hellen Triebspitze auf 3% an, sank aber schon im September bei beiden wieder auf 0,01% ab.

#### 4. Die Resistenz verschiedener Epidermen derselben Pflanze (*Cyclamen persicum* und *Cyclamen europaeum*)

Für Permeabilitätsstudien wurden schon mehrfach verschiedene Gewebe und Zellsorten derselben Pflanze herangezogen (Höfler und Stiegler 1950, Hurch 1955, Höfler 1956, 1957, Url 1951, 1952), zu Resistenzuntersuchungen wurde dies hingegen erst selten getan (Reuter 1941, Biebl 1950a).

Bei *Cyclamen persicum* wurde an verschiedenen alten Blättern mit roter und grüner Unterseite das Verhalten der unteren und oberen Blattepidermen sowie der Stengelepidermis geprüft. Zum Vergleich wurde *Cyclamen europaeum* herangezogen, und zwar eine Waldpflanze mit roter Blattunterseite und eine Topfpflanze mit grüner Unterseite.

Die Resistenz wurde wiederum geprüft gegen Borsäure, Zink-, Mangan-, Chromsulfat und außerdem gegen Aluminiumchlorid ( $\text{AlCl}_3$ ).

Die Resistenzgrenzen der Blattober- und Blattunterseite von *Cyclamen persicum* waren bei den im Jänner und Februar durchgeführten Untersuchungen gleich in Zinksulfat (0,001%) und in Mangansulfat (über 3%) sowohl bei älteren und jüngeren Blättern wie auch bei solchen mit roter und mit grüner Blattunterseite. Gegen Borsäure und Aluminiumchlorid erwies sich die rote wie auch die grüne Blattunterseite empfindlicher als die entsprechenden Blattoberseiten. Letztere lebten noch in 1% Borsäure gegenüber 0,1% bei Blattunterseiten von Blättern verschiedenen Alters. In Aluminiumchlorid lebten die Epidermen der Oberseiten in 1% Lösung, die der Blattunterseiten hingegen nur in 0,1%, wobei die grünen Unterseiten der älteren Blätter etwas resistenter waren. Die Resistenz der Blattunterseite gegenüber Chromsulfat war bei Blättern mit roter Unterseite geringer (0,0001%) als die der Blattoberseite und der grünen Unterseite älterer Blätter (0,001%).

Ein Vergleich der Resistenzen von *Cyclamen persicum* und *Cyclamen europaeum* ergab für die Blattoberseite gleiche Lebensgrenzen in Borsäure

(1%), Chromsulfat (0,001%) und Mangansulfat (über 3%), für die Unterseite gleiche in Zinksulfat (0,001%) und Mangansulfat (über 3%) und annähernd gleiche in Chromsulfat (0,0005%). Hingegen erwies sich die Blattoberseite von *Cyclamen europaeum* in Zinksulfatlösungen (0,01%) um eine Konzentrationsstufe resistenter als die Blattoberseite von *Cyclamen persicum* (0,001%) und gegen Aluminiumchlorid mit 0,05% um eine Konzentrationsstufe empfindlicher als die von *Cyclamen persicum* (0,5%). Die Blattunterseite war hingegen bei *Cyclamen europaeum* resistenter gegen Borsäure (1%) als bei *Cyclamen persicum* (0,1%) und um ein wesentliches empfindlicher gegen Aluminiumchlorid (0,005%) als bei *Cyclamen persicum* (0,1—0,5%).

Der Vergleich der Resistenzen der Epidermen unterseits roter und grüner Blätter von *Cyclamen europaeum* wurde im Februar vorgenommen. Dazu wurde die Waldpflanze mit roter Blattunterseite unter dem Schnee hervorgeholt, während die grünblättrige Pflanze schon ein halbes Jahr in Topfkultur gehalten worden war. Die Resistenzgrenzen waren für alle untersuchten Substanzen fast völlig gleich. Nur gegen Aluminiumchlorid war die grüne Unterseite der Topfpflanzen (0,01%) etwas empfindlicher als die rote Unterseite der Waldpflanzen (0,1%). Auf Grund dieses trotz so verschiedener Außenbedingungen ähnlichen Verhaltens der *Cyclamen europaeum*-Pflanzen darf man wohl folgern, daß auch bei den Unterschieden zwischen der Glashauspflanze *Cyclamen persicum* und der Freilandpflanze *Cyclamen europaeum* die Außenfaktoren keinen wesentlichen Einfluß ausgeübt haben, sondern daß die gefundenen Resistenzverschiedenheiten auf spezifische Plasmaunterschiede hinweisen.

Anzumerken ist noch eine Erscheinung, die auch in früheren Versuchen gelegentlich zu beobachten war, daß nämlich niedrigere Konzentrationen manchmal schädlicher wirkten als höhere, vor allem auf anthokyanhaltige Epidermen der Blattunterseite. Dies trat bei Lösungen von Mangansulfat, Aluminiumchlorid und Borsäure etwa bei 0,001%, bei Zinksulfat bei 0,0001% auf. Etwas höhere Konzentrationen bewirkten dann keine Schädigung und erst in noch stärkeren Lösungen, bei Mangansulfat z. B. erst über 3%, kam es zum allgemeinen Absterben der Schnitte. Auf diese Erscheinung soll in der Besprechung der Versuche noch zurückgekommen werden.

### Besprechung der Versuche

Resistenzversuche in abgestuften Lösungen von Schwermetallsalzen (Zn, Mn, Cr, V) oder von Borsäure haben gezeigt, daß die Protoplasmen verschiedener Pflanzen charakteristische Resistenzunterschiede besitzen, die in ihrer Kombination geeignet sind, verschiedene pflanzliche Plasmen zu kennzeichnen (Biebl 1947—1950). Einzelbeobachtungen, die auch in einer neueren Untersuchung über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen 2,4-D (Biebl 1953) ihre Bestätigung fanden, wiesen ferner darauf hin, daß die Resistenz pflanzlicher Zellen gegenüber dem einen oder anderen einwirkenden Stoff sich im Laufe des Jahres ändern kann. Die Untersuchung solcher



chemischer Resistenzänderungen im Verlaufe der jahreszeitlichen Entwicklung war Kernpunkt vorliegender Arbeit.

Um den Einfluß der jahreszeitlich verschiedenen Umweltfaktoren vom Alter der untersuchten Blatt- oder Stengelepidermen trennen zu können, wurden jeweils gleichzeitig verschieden alte Organe untersucht. Dies war entweder dadurch möglich, daß an Pflanzen mit langlebigen, überwinternden Blättern junge und alte Blätter nebeneinander auf ihr Resistenzverhalten geprüft wurden (*Anemone hepatica*, *Cyclamen europaeum*, *Hedera helix*), daß die Versuchspflanzen mehrmals im Jahr frisch angebaut wurden, so daß zum gleichen Zeitpunkt verschieden alte Pflanzen zur Verfügung standen (Rettich, Weiße Rübe, Kohlrabi, Möhre, Kartoffel, Tomate) oder daß schließlich an ein und demselben einjährigen Individuum die Epidermen jüngerer und älterer Sprosse verglichen wurden.

Alle diese verschiedenen Untersuchungen erbrachten die gemeinsame Tatsache, daß die meisten Pflanzen im Laufe des Jahres zumindest gegenüber dem einen oder anderen Stoff ihre chemische Resistenz ändern, woran Alter des Gewebes und jahreszeitliche Einflüsse in wechselnd starkem Ausmaß beteiligt zu sein scheinen. In den meisten Fällen ist in Abhängigkeit vom Alter eine Resistenzsteigerung von jüngsten Stadien bis zur Vollentwicklung zu beobachten. Besonders trifft dies für die Resistenz gegen Mangan- und Zinksulfat zu. In Ausnahmefällen nimmt die Resistenz alter, überwinterter Blätter wieder ab. Da dann die niedrigere Resistenz in den alten Organen mit der noch niederen der jungen Organe zeitlich zusammenfällt, könnte hier auch an einen jahreszeitlichen Einfluß gedacht werden. Und auch in solchen Fällen ist ein Einfluß der klimatischen Verhältnisse der Jahreszeit in Betracht zu ziehen, wo Pflanzen, die allgemein eine Resistenzzunahme von jung zu alt zeigen, bei einem späteren Anbau im Jahr schon mit einer höheren Resistenzstufe beginnen als die früher angebauten (Rettich, Kohlrabi). Relativ häufig findet sich Resistenzkonstanz in allen Altersstufen gegen Borsäure (z. B. Kohlrabi, Kartoffel, Tomate, *Salvia*-Arten). Eine seltene Resistenzkonstanz nicht nur gegen Borsäure, sondern auch gegen Zink- und Mangansulfat zeigten in den Beobachtungsmonaten Juni bis Oktober die Sproßepidermen von *Solanum lycopersicum*, und zwar in gleicher Höhe in den jüngsten wie in den ältesten Seitensprossen. Hier sind Alter und Jahreszeit ohne Einfluß.

Verschiedene Epidermen von *Cyclamen persicum* bzw. von *Cyclamen europaeum* (Blattober- und -unterseite, Stengel, Blattstiel) zeigen fast gleiche Resistenzeigenschaften. Nur gegen Borsäure und  $AlCl_3$  erwiesen sich sowohl die roten wie auch die grünen Blattunterseiten von *Cyclamen persicum* empfindlicher als die entsprechenden Blattoberseiten. Bei unterseits roten und grünen Blättern von *Cyclamen europaeum* hingegen fehlten auch diese Unterschiede.

Auch ältere Beobachtungen ergaben häufig ein gleiches chemisches Resistenzverhalten verschiedener Zellsorten einer gegebenen Pflanze. So besitzen grüne und gelbliche Mesophyllzellen panaschierter *Abutilon Thompsonii*-Blätter gleiche Resistenz gegen Borsäure, Zink-, Mangan- und Vana-

dysulfat (Biebl 1950 c). Auch die Blattstielepidermen von fünf verschiedenen Sorten von *Solanum tuberosum* und die Epidermen der Dunkeltriebe von vier verschiedenen Kartoffelsorten zeigten gegen die genannten Stoffe gleichartige Resistenzgrenzen (Biebl 1949). Demgegenüber bot *Atropa Belladonna* in  $\text{VOSO}_4$ -Lösung ein Beispiel für eine größere Empfindlichkeit der Epidermis der Blattoberseite gegenüber jener der Blattunterseite und des Blattstiels (Biebl 1950 a). Subepidermiszellen zeigten sich bei verschiedenen Pflanzen resistenter als die Epidermen. Ein auffallend gegensätzliches Verhalten der Resistenz gegen Borsäure und Zinksulfat war schließlich an den Blättern des Laubmooses *Mnium rostratum* zwischen den Blattrand- und Mittelrippenzellen einerseits und den Blattflächenzellen andererseits zu beobachten (Biebl 1947 b).

Über die Ursachen der alters- oder jahreszeitlich bedingten chemischen Resistenzänderungen wie überhaupt der Resistenzunterschiede zwischen verschiedenen Plasmasorten lassen sich bisher noch keinerlei gesicherte Angaben machen. Ebenso wenig ist es möglich, bestimmte Beziehungen zwischen chemischem Resistenzverhalten und anderen im zellphysiologischen Versuch faßbaren plasmatischen Veränderungen (osmotischer Wert, Permeabilität, Viskosität usw.) im Verlaufe des Alterns (vgl. Paech 1940, Fischer 1950) aufzustellen.

Höfler (1951) schreibt in einer Untersuchung über die Plasmolyse mit Natriumkarbonat: „Wenn eine Substanz binnen gleicher Zeit die eine Zelle tötet, die andere am Leben läßt, so kann dies zweierlei Ursache haben: das Plasmalemma ist bei den einen Zellen für die betreffenden Stoffe durchlässig, bei anderen nicht, d. h. die Intrabilität ist hoch bzw. niedrig. Oder die Stoffe treten in beiden Fällen ein, aber die einen Zytoplasmen sind gegen sie unempfindlich, die anderen werden getötet.“ Diese zwei Möglichkeiten könnten durchaus auch für unsere Resistenzversuche zutreffen. Danach läge der Schwerpunkt der Resistenz entweder im Plasmalemma oder die verschiedene Widerstandsfähigkeit käme dem gesamten Plasma zu.

Betrachten wir daraufhin die chemischen Resistenzen unserer Versuchspflanzen, so dürfen wir uns vielleicht in allen Fällen, in denen die Resistenzgrenzen bei niederen Konzentrationen liegen, von vornherein für den zweiten Fall entscheiden. Es ist kaum anzunehmen bzw. nicht wahrscheinlich, daß z. B. bei einer letalen Konzentration von 0,1%, bei welcher die Lösung also zweifellos ins Plasma eingedrungen ist und dieses getötet hat, das Plasmalemma einer Konzentration von 0,01% den Eintritt verwehrt hat.

Anders liegt der Fall bei jenen Zellen, die z. B. sogar durch 15–20%ige (0,66–0,88 Mol) hypertonische Mangansulfatlösungen nicht geschädigt werden und zwei oder mehr Tage (bei einigen Laub- und Lebermoosen bis zu acht Tagen beobachtet! Biebl 1949) in diesen hochkonzentrierten Lösungen plasmolysiert liegen können, ohne dadurch getötet zu werden. Diese Fälle ähneln sehr den Beobachtungen Höflers in seiner oben angeführten Untersuchung, wo manche Desmidiaceen-Zellen Plasmolyse in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tagelang ertragen, während Gewebszellen von Anthophyten durch hypertonische

Sodalösungen entweder sofort getötet werden oder bald nach erfolgter Plasmolyse Plasmaaufquellungen erfahren und dann ganz oder bis auf den Tonoplasten absterben. Höfler nimmt für diese Sonderfälle hoher Resistenz gegen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eine ungleiche Durchlässigkeit bzw. Schutzwirkung der äußeren Plasmagrenzschichte als höchstwahrscheinliche Ursache an.

In diesem Zusammenhang kommt nun den Beobachtungen über die letale Wirkung mancher Substanzen in niedrigeren Konzentrationen, die in höheren Konzentrationen dann wieder unschädlich erscheinen und erst bei noch stärkerer Konzentration zum Tod führen, besondere Beachtung zu. Wir haben z. B. beim Rettich und bei der Weißen Rübe darauf hingewiesen. Dort fanden sich häufig in 0,1 und 1%  $\text{MnSO}_4$  eine große Anzahl von abgestorbenen Zellen, während in 3%  $\text{MnSO}_4$  wiederum alle Zellen lebten. Solche Beobachtungen wurden auch schon von anderen Autoren gemacht. Iljin (1955) erhielt z. B. an Zellen von *Reseda lutea* nach 48stündigem Aufenthalt in NaCl (ebenso in KCl) bei Verwendung verschiedener Konzentrationen folgende Ergebnisse: In 0,5 und 0,8 Mol NaCl waren alle Zellen tot (Beginn des Absterbens schon nach 5 Stunden), in 1,2 Mol lebte ein Teil der Zellen, in 1,8–5,0 Mol aber lebten alle Zellen. Von 27 von Iljin untersuchten Pflanzen verhielten sich 21 nach diesem Schema. Die übrigen starben mit zunehmender Konzentration der Lösung ab. In unseren Versuchen, wo diese Erscheinung hauptsächlich in  $\text{MnSO}_4$ -Lösungsreihen zu beobachten war, war allerdings die zunehmende Schadenwirkung mit Ansteigen der Konzentration die Regel und das Absterben in den verdünnten Lösungen bei gleichzeitiger Widerstandsfähigkeit in den konzentrierten die Ausnahme. Manches scheint auch darauf hinzuweisen, daß diese beiden Erscheinungen unter bestimmten, noch nicht näher bekannten äußeren und inneren Umständen bei der gleichen Pflanze auftreten können. Hier könnten wir also vielleicht annehmen, daß es ab einer bestimmten Konzentration des  $\text{MnSO}_4$  zu einer „Abdichtung“ des Plasmalemmas kommt, während schwächere Lösungen noch leichter ins Binnenplasma eintreten und dieses schädigen können. Betont sei, daß es sich bei unseren Versuchen um  $\text{MnSO}_4$ -Konzentrationen handelte, die noch weit unter dem plasmolytischen Grenzwert lagen. Nur in einzelnen Fällen, wie z. B. bei den Laub- und Lebermoosen, lagen die letzten letalen Grenzen so hoch, daß die schädlichen Konzentrationen bereits in den Bereich der Hypertonie fielen.

Daß sich Protoplaste mancher Pflanzen, ähnlich wie in unseren hochkonzentrierten Mangansulfatlösungen, auch in anderen hypertonen Schwermetallsalzlösungen, wie Kupfer- oder Zinksulfat, lange im plasmolysierten Zustand erhalten können, gibt auch Pringsheim (1924) an. Der Verfasser teilt mit, daß er z. B. fast alle Zellen des Laubmooses *Mnium cuspidatum* noch nach 3 Tagen Plasmolyse in 18–20% Zinksulfat durch Übertragung in Wasser wieder deplasmolysieren und dann mit  $\text{KNO}_3$  neuerlich plasmolysieren konnte und daß in mit  $\text{ZnSO}_4$  (14,4%) plasmolysierten Zellen von *Allium*, *Rhoeo*, *Elodea densa* und *Elodea canadensis* nach 40 Minuten bis 5 Stunden noch oft kräftige Plasmaströmung zu sehen war. Es ist nach unseren Erfahrungen wohl als sicher anzunehmen, daß be-

deutend schwächere, hypotonische Lösungen innerhalb von 48 Stunden den Zelltod herbeigeführt hätten. Die höchste an unseren Versuchsobjekten im abgestuften Reihenversuch beobachtete Zinkresistenz zeigten vollentwickelte Efeublätter im Dezember und Jänner mit einer Lebensgrenze bei 10%  $\text{ZnSO}_4$ . Aber auch dies entspricht erst einer Konzentration von 0,34 Mol, ist also noch hypotonisch. Die durchschnittlichen Lebensgrenzen bei den bisher untersuchten Pflanzenepidermen liegen aber viel tiefer, etwa bei 0,01% (= 0,0034 Mol) und darunter. Auch Blättchen von *Mnium punctatum* und *Mnium rostratum* starben innerhalb von 48 Stunden in 1 bzw. 0,01%  $\text{ZnSO}_4$  ab (Biebl 1947). Hypertonische Zinksulfatlösungen wurden nicht geprüft. Solche Versuche wären nachzutragen.

Kaho (1933), ein Schüler Lepeschkins, ist der Ansicht, daß die Schwermetallsalze bei der Berührung mit der Pflanzenzelle auf der Plasmaoberfläche eine Schutzschicht (irreversibel koagulierte Oberflächenschicht) erzeugen, die das Eindringen des Salzes auf einige Zeit verhindert und die größere Menge des Plasmas vor momentaner Abtötung schützt. Auch Pringsheim wies auf diese Möglichkeit hin.

Nach Schindler (1944) wirken Nickel- und Kobaltsalze „erhärtend“ auf die Protoplastenoberfläche. Diese Veränderung des Plasmalemmas äußert sich schon beim ersten Plasmolyseeintritt durch fädiges Ausziehen des Zytoplasmas, also einer verstärkten Bildung von Hechtschen Fäden. Schindler hebt auch hervor, daß sich die Salze je nach dem Anion in ihrer Wirkung gänzlich verschieden verhalten.

Der Annahme Höflers, daß in bestimmten Fällen die Resistenzunterschiede verschiedener Plasmen auf Verschiedenheiten ihrer Plasmalemmen zurückgehen, darf somit ergänzend hinzugefügt werden, daß die verschiedene „Dichte“ des Plasmalemmas nicht von vornherein gegeben sein muß, sondern sich unter Umständen erst bei Einwirkung höherer Salzkonzentrationen ausbilden kann. In diesen Fällen könnten daher niedrigere Konzentrationen stärker schädigen als höhere. Neu ist, daß solche Veränderungen des Plasmalemmas nicht allein am plasmolytisch abgehobenen Protoplasten, sondern auch schon im hypotonischen Bereich auftreten können.

Auch die Beobachtung von Kamiya (1939), daß 1–3 Wochen in Wasser liegende Schnitte der Außenepidermis von Zwiebelschuppen (*Allium cepa*) von der Mitte her abzusterben beginnen, so daß schließlich nur am Rand des Schnittes ein Ring von lebenden Zellen erhalten bleibt, läßt sich mit der Vorstellung einer sekundären Veränderung der äußeren Plasmagrenzschicht vereinigen. Dafür würden auch die plasmolytischen Beobachtungen Höflers (1934) sprechen, wonach an Zwiebelepidermisschnitten bei Plasmolyse mit 0,6 Mol KCl eine Zonenbildung auftritt: eine Randzone mit wechselnden „pathologischen“ Plasmolyseformen, dann eine Zone mit starker Kappenplasmolyse und schließlich ein Mittelfeld mit „normaler“ Konvexplasmolyse.

Unsere Beobachtungen haben weiter gezeigt, daß die im Verlauf des Jahres festgestellten Resistenzänderungen entweder in gleicher Weise alle verwendeten Teststoffe oder aber nur den einen oder anderen von ihnen

betreffen können. So sehen wir z. B. bei *Hedera helix* die Mangan- und Zinkresistenz von einer Lebensgrenze bei 0,0001% in jugendlichen Blättern im Mai bis auf 3–10% in vollentwickelten Blättern im November und Dezember ansteigen, während bei *Cyclamen europaeum* mit gleichfalls gleich großer Zink- und Manganempfindlichkeit im Mai und Juli (Lebensgrenze bei 0,0001%) die Resistenz gegen  $\text{MnSO}_4$  im November bis 10%, die gegen  $\text{ZnSO}_4$  aber nur auf 0,001% ansteigt. Es müssen sich also die für die Resistenz verantwortlichen Zustände im Zytoplasma oder im Plasmalemma im Laufe der Entwicklung in einer für die beiden Schwermetallsalze verschiedenen Weise geändert haben. Die sich aus Untersuchungen von Lieben und Jesser (1956, zit. in Schindler 1944) ergebende Tatsache, daß z. B. Nickel-, Kobalt- oder Kupfereiweiß-Verbindungen trotz mancher äußerer Ähnlichkeiten in ihrem feineren chemischen Aufbau grundlegende Unterschiede aufweisen, kann vielleicht die untereinander oft große Verschiedenheit in der Mangan-, Zink- oder Chromresistenz verständlich machen.

Wir müssen uns einstweilen mit dem Ergebnis bescheiden: Im Verlauf der jahreszeitlichen Entwicklung bzw. des Alterns erfährt das Plasma der meisten Pflanzen Veränderungen, die eine ganz bedeutende Änderung seiner Resistenz gegenüber verschiedenen chemischen Substanzen ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{Cr}_2\text{SO}_4$  und nach früheren Untersuchungen  $\text{VOSO}_4$ , 2,4-D) zur Folge haben kann. Wesentlich ist dabei, daß diese Resistenzänderungen gegenüber den untersuchten Stoffen nicht gleichlaufend oder gleich stark zu sein brauchen. Nur wenige Plasmen erweisen sich während des ganzen Jahres gegen einen oder gegen einige dieser Stoffe resistenzkonstant. Ob die den Resistenzänderungen zugrunde liegenden plasmatischen Veränderungen im Binnenplasma oder in besonderen Fällen vielleicht vorwiegend im Plasmalemma erfolgen und welcher Art sie sind, wissen wir noch nicht.

### Zusammenfassung

1. Epidermisschnitte von Blättern, Blattstielen oder Stengeln der Versuchspflanzen wurden in konzentrationsabgestufte Lösungsreihen von  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Borsäure),  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  und  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  (0,0001–1 bzw. 20%) durch 48 Stunden eingelegt und dann auf ihren Lebenszustand untersucht. Die eben noch vitale Grenzkonzentration wurde als Resistenzgrenze bezeichnet.

2. Um den jahreszeitlichen Umwelteinfluß vom Einfluß des Entwicklungsalters unterscheiden zu können, wurden an einer Reihe von Objekten zur gleichen Jahreszeit verschieden alte Individuen bzw. verschieden alte Stengel oder Blätter untersucht.

3. Von *Anemone hepatica*, *Cyclamen europaeum* und *Hedera helix* konnten nebeneinander junge, in Entfaltung begriffene Blättchen und alte, überwinterte Blätter untersucht werden. Blattepidermen aller drei Objekte zeigen gegen  $\text{MnSO}_4$  mit zunehmendem Alter eine starke Steigerung der Manganresistenz von 0,0001% bis auf 10% und annähernde Resistenzkonstanz bzw. nur eine mit der Entwicklung leicht ansteigende, im Alter aber wieder etwas absinkende Resistenz gegen Borsäure. Die Resistenz gegen



ZnSO<sub>4</sub> nimmt bei *Anemone hepatica* und *Cyclamen europaeum* nur etwas, bei *Hedera helix* hingegen gleich stark wie gegen MnSO<sub>4</sub> zu.

4. Von den untersuchten Kulturpflanzen erwiesen sich die Cruciferen (Rettich, Weiße Rübe und Kohlrabi) besonders gegen MnSO<sub>4</sub> und ZnSO<sub>4</sub> als stark resistenzveränderlich, *Daucus carota* und *Solanum tuberosum* zeigten geringe Resistenzänderungen, und die Tomate, *Solanum lycopersicum*, war in ihrer Hauptentwicklungszeit von Juni bis Oktober gegen B, Zn und Mn nahezu resistenzkonstant.

5. In den Monaten Juni bis Oktober zeigten die Epidermen verschieden alter Sprosse von sieben Wildpflanzen (*Salvia pratensis*, *Salvia glutinosa*, *Salvia verticillata*, *Ballota nigra*, *Saponaria officinalis*, *Convallaria majalis* und *Vitis vulpina*) gleichfalls altersbedingte Resistenzverschiebungen, wobei wiederum die Manganresistenz die größten Unterschiede aufwies.

6. Die Resistenz verschiedener Epidermen (Blattober- und -unterseite, Blattstiel, Stengel) von *Cyclamen europaeum* und *Cyclamen persicum* zeigte keine großen Unterschiede. Lediglich die Blattunterseite von *Cyclamen persicum* erwies sich gegenüber der Blattoberseite gegen Borsäure und gegen Aluminiumchlorid als etwas empfindlicher.

7. Im wesentlichen sind die Resistenzänderungen vom Alterszustand der Zellen abhängig, zum Teil scheinen aber auch jahreszeitliche Außeneinflüsse von Bedeutung zu sein.

8. Die Frage, ob das Plasmalemma oder das gesamte Zytoplasma für die Höhe der Resistenz der Zelle maßgebend ist, wird diskutiert. Es scheint so zu sein, daß im allgemeinen die Empfindlichkeit des Zytoplasmas die Höhe der Resistenz bestimmt, daß aber in Fällen besonders hoher Resistenz Veränderungen im Plasmalemma (Abdichtung und damit geringere Intrabilität) das Absterben der Zellen verhindern können.

9. Nur wenige Plasmen erweisen sich während des ganzen Jahres gegen einen oder gegen einige der angewandten Teststoffe völlig resistenzkonstant. Die Tatsache, daß aber die Resistenzveränderungen im Laufe der Entwicklung nicht alle Teststoffe in gleicher Weise treffen, läßt annehmen, daß die ihnen zugrunde liegenden plasmatischen Veränderungen für die verschiedenen chemischen Einwirkungen nicht von gleicher Bedeutung sind. Worin diese plasmatischen Veränderungen bestehen, steht noch völlig offen.

#### Literatur

- Bibliography of the literature of the Minor Elements and their relation to plant and animal nutrition. 4. ed., Vol. I 1948, Vol. II 1951, Vol. III 1953, Chil. Nitr. Educ. Bur. Inc., New York.
- Biebl, R., 1939: Protoplasmatische Ökologie der Meeresalgen. Ber. dtsh. Bot. Ges. 57 (78).
- 1947 a: Die Resistenz gegen Zink, Bor und Mangan als Mittel zur Kennzeichnung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten. Sitzber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 155, 145.
- 1947 b: Über die gegensätzliche Wirkung der Spurenelemente Zink und Bor auf die Blattzellen von *Mnium rostratum*. Öst. Bot. Z. 94, 61.

- 1949: Vergleichende chemische Resistenzstudien an pflanzlichen Plasmen. *Protoplasma* 39, 1.
- 1950 a: Über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Vanadium. *Protoplasma* 39, 251.
- 1950 b: Zellphysiologische Untersuchungen an Gemüsepflanzen. *Biol. gen.* 19, 236.
- 1950 c: Zellphysiologische Beobachtungen an panaschierten *Abutilon*-Pflanzen. *Öst. Bot. Z.* 97, 168.
- 1952 a: Resistenz der Meeresalgen gegen sichtbares Licht und gegen kurzwellige UV-Strahlen. *Protoplasma* 41, 353.
- 1952 b: Ecological and non-environmental constitutional resistance of the protoplasm of marine algae. *Journ. Mar. Biol. Ass. Un. Kingd.* 31, 307.
- 1953: Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen 2,4-D. *Protoplasma* 42, 193.
- Blackmann, G. E., 1952: Studies in the Principles of Phytotoxicity I. *Journ. Exp. Bot.* 3, 1.
- Fischer, H., 1950: Über protoplasmatische Veränderungen beim Altern von pflanzlichen Zellen. Sammelreferat. *Protoplasma* 39, 661.
- Frohberger, E., 1951: Zur Wirkung der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf Gewebe und Stoffwechsel der Pflanze. Höfchen-Briefe, Veröff. d. „Bayer“-Pflanzenschutzabt. Leverkusen 4, 236.
- Höfler, K., 1932: Vergleichende Protoplasmatik. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 50, (53).
- 1934: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. *Z. f. wiss. Mikr.* 51, 70.
- 1936: Permeabilitätsunterschiede in verschiedenen Geweben einer Pflanze und ihre vermutlichen Ursachen. *Mikrochemie (Molisch-Festschrift)* 224.
- 1937: Spezifische Permeabilitätsreihen verschiedener Zellsorten derselben Pflanze. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 55 (155).
- 1939: Nekroseformen pflanzlicher Zellen. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 56, 451.
- 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. *Protoplasma* 40, 426.
- und H. Stiegler, 1950: Permeabilitätsverteilung in verschiedenen Geweben der Pflanze. *Protoplasma* 9, 469.
- Hofmeister, L., 1958: Verschiedene Permeationsreihen bei einer und derselben Zellsorte von *Ranunculus repens*. *Jb. wiss. Bot.* 86, 401.
- Hurch, H., 1933: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilitätsverteilung in den verschiedenen Geweben des Blattes. *Beih. bot. Zentrbl.* 50.
- Iljin, W. S., 1935: Das Absterben der Pflanzenzellen in reinen und balancierten Salzlösungen. *Protoplasma* 24, 409.
- Kaho, H., 1933: Das Verhalten der Pflanzenzellen gegen Schwermetallsalze. *Planta* 18, 664.
- Kamiya, N., 1939: Zytomorphologische Plasmolysestudien an *Allium*-Epidermen. *Protoplasma* 32, 373.
- Kessler, W., 1935: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanze. *Planta* 24, 313.
- und W. Ruhland, 1938: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. *Planta* 28, 159.
- Krassinsky, N., 1929: Über jahreszeitliche Veränderungen der Permeabilität des Protoplasmas. *Protoplasma* 9, 622.
- Lenk, J., 1953: Über die Plasmapermeabilität einer *Spirogyra* in verschiedenen Entwicklungsstadien und zu verschiedenen Jahreszeiten. *Sitzber. d. Öst. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. I*, 162, 235.
- Lidforss, B., 1907: Die wintergrüne Flora. Eine biologische Untersuchung. *Lunds Univ. Arsskr.*, N. F., 2 H. Nr. 13.

- Linser, H., 1951: Unkrautbekämpfung auf hormonaler Basis. Die Bodenkultur 5, 191.
- Marklund, G., 1956: Vergleichende Permeabilitätsstudien an pflanzlichen Protoplasten. Acta bot. Fenn. 18, 1.
- Paeck, K., 1940: Veränderungen des Plasmas während des Alterns pflanzlicher Zellen. Planta 31, 293.
- Pisek, A., 1950: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. Protoplasma 39, 129.
- Pringsheim, E., 1924: Über Plasmolyse durch Schwermetallsalze. Beih. bot. Zentrbl. 41, I. Abt., 4.
- Reuter, L., 1941: Über die Salzresistenz der Epidermiszellen des Blattes von *Pisum sativum*. Protoplasma 35, 330.
- 1949: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Sammelref. Phytion 1, 229.
- Rossi, W., 1951: Über die chemische Resistenz pflanzlicher Plasmen und ihre Veränderung mit dem Entwicklungszustand. Diss. Univ. Wien (unveröff.).
- Scharrer, K., 1944: Biochemie der Spurenelemente. Berlin, Parey.
- Schindler, H., 1949: Protoplasmatod durch Schwermetallsalze I. Protoplasma 38, 225.
- Steiner, M., 1939: Die Zusammensetzung des Zellsaftes bei höheren Pflanzen in ihrer ökologischen Bedeutung. Erg. Biol. 17, 151.
- Url, W., 1951: Permeabilitätsverteilung in den Zellen des Stengels von *Taraxacum officinale* und anderer krautiger Pflanzen. Protoplasma 40, 475.
- 1952: Unterschiede der Plasmapermeabilität in den Gewebeschichten krautiger Stengel. Physiologia Plantarum 5, 135.
- Ursprung, A., und B. Blum, 1911: 1. Verteilung des osmotischen Wertes in der Pflanze, 2. Einfluß der Außenbedingungen auf den osmotischen Wert, 3. Über die periodischen Schwankungen des osmotischen Wertes. Ber. deutsch. Bot. Ges. 34, 88.
- Weber, Fr., 1929: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Protoplasma 8, 291.
- und H. Hohenegger, 1923: Reversible Viskositätserhöhung des Protoplasmas bei Kälte. Ber. deutsch. Bot. Ges. 41, 198.

# Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der Anthocerotales

Von

Hans Kaja

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster

Mit 4 Textabbildungen und 1 Tafel

(Eingelangt am 12. April 1954)

Die *Anthocerotales* nehmen innerhalb der Bryophyten in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein, indem sich hier neben primitiven, algenartigen Merkmalen Eigenschaften finden, die eine mehr oder weniger enge Verwandtschaft mit den Farnen vermuten lassen (Campbell 1925, 1928). Eine besonders hervorstechende Erscheinung sind die großen, algenartigen Chromatophoren, die durch den Besitz eines Pyrenoids ausgezeichnet sind. Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Chromatophoren der *Anthocerotales* bereits mehrfach Gegenstand morphologischer und entwicklungsgeschichtlicher Untersuchungen waren. Da die Zellen der *Anthocerotales* meist nur einen großen Chromatophor enthalten, läßt sich hier das Verhalten der Chromatophoren im Entwicklungszyklus mit aller Deutlichkeit verfolgen. Schon Schimper (1885) konnte für *Anthoceros laevis* die Kontinuität der Chromatophoren nachweisen, und Scherrer (1914) kommt in einer ausführlichen Arbeit zu der Feststellung, daß die Chromatophoren von *Anthoceros punctatus* und *Anthoceros Husnoti* „während der gesamten Entwicklung des Gameto- und Sporophyten als morphologische Individualitäten erhalten bleiben“.

Eine besondere Eigentümlichkeit der *Anthoceros*-Chromatophoren stellen die bereits von Schmitz (1882) für eine nicht näher bezeichnete *Anthoceros*-Art beschriebenen Pyrenoide dar, die in späteren Arbeiten von Scherrer (1913, 1914), McAllister (1914) und Lander (1935) wiederholt bei verschiedenen *Anthoceros*-Arten einer näheren Untersuchung unterzogen wurden.

Über die Struktur der *Anthoceros*-Chromatophoren und das Vorkommen von Grana in denselben liegen nur wenige Mitteilungen vor. Menke und Koydl (1939) und Menke (1940) konnten den bereits durch Weber (1936) und Weier (1937) mit Hilfe polarisationsoptischer Methoden wahr-

scheinlich gemachten lamellaren Feinbau der *Anthoceros*-Chromatophoren durch direkte Beobachtung im UV-Mikroskop nachweisen. Menke (1940) bezeichnet die Chromatophoren — abgesehen von dem zusammengesetzten Pyrenoid und den mehr oder weniger reichlichen Stärkeeinlagerungen — als völlig homogen und granafrei. De Rezende-Pinto (1948) spricht dagegen von einem schraubigen Aufbau (structure helicoidale) der *Anthoceros*-Chromatophoren. Auch sollen unter bestimmten Bedingungen Grana zu sehen sein.

Im Rahmen einer Untersuchung über die Chloroplasten der Moose (Kaja 1954) erschien es daher wünschenswert, die Chromatophoren der Anthocerotales erneut einer kritischen Betrachtung zu unterziehen, wobei insbesondere das vieldiskutierte Pyrenoidproblem berücksichtigt werden sollte.

### Beobachtungen an *Anthoceros laevis* L.

Das Material für diese Untersuchungen wurde im Herbst 1950 und 1951 im Sauerland gesammelt und in Tonschalen im schattigen Gewächshaus weiterkultiviert. Die Untersuchungen wurden vorzugsweise an lebendem Material durchgeführt. Ganze Thalli oder Handschnitte von denselben wurden in isotonische (0,2 m) Saccharoselösung eingelegt und zur Beobachtung darin belassen. Für einige spezielle Problemstellungen war die Verwendung fixierten Materials nicht zu umgehen. Die angewandten Methoden sollen jeweils innerhalb der Arbeit erörtert werden. Für die Arbeiten stand ein Leitzsches Forschungsmikroskop, Stativ BST, mit  $\frac{1}{12}$  Ölimmersion (100:1) und  $\frac{1}{18}$  Fluorit (114:1), zur Verfügung. Als Lichtquelle diente eine Niedervolt-Mikroskopierleuchte von Zeiß-Winkel.

### Normale Gestalt der Chromatophoren

Flächenansicht: In erwachsenen, lebenden Zellen des Thallus von *Anthoceros laevis* findet man je einen großen Chromatophor, dessen Grundform annähernd scheibenförmig ist. Der Durchmesser beträgt im Mittel 20  $\mu$ . Der Rand des Chromatophors ist gewöhnlich unregelmäßig gestaltet, indem sich hier pseudopodienartige Fortsätze von wechselnder Gestalt bilden. Diese Fortsätze erscheinen im durchfallenden Licht sehr schwach grün gefärbt und sind meistens völlig homogen. Nur gelegentlich findet man hier vereinzelt einige kleinere Stärkekörner. Die zentralen Teile des Chromatophors heben sich von dieser Randzone durch eine viel intensivere Grünfärbung ab. Bei oberflächlicher Betrachtung erkennt man zunächst in reichlicher Menge sehr dicht gelagerte Stärkekörner, die fast über den ganzen Chromatophor verteilt sind. In gesunden, nicht geschädigten Chromatophoren bieten sich die Stärkekörner in der mehr oder weniger scheibenförmigen Flächenansicht dar. Bereits eine leichte Schädigung der Zellen macht sich jedoch durch eine Verlagerung der Stärkekörner um 90° bemerkbar, wobei nun die linsenförmige Gestalt der Stärkekörner zu erkennen ist (Tafelfig. 3). Es fällt dabei auf, daß die Stärkekörner sozusagen von einem Zentrum des Chromatophors aus strahlig angeordnet sind. Dieses Zentrum hebt sich durch abweichende Lichtbrechung von den übrigen

Teilen des Chromatophors und den Stärkekörnern ab und eingehende Betrachtung läßt hier eine Vielzahl kleiner, scheibchenförmiger Körperchen erkennen, die — selbst nicht gefärbt — einem intensiv grün gefärbten Stroma eingelagert sind. Es handelt sich hier um die bereits von Scherrer (1913, 1914) beschriebenen Pyrenoidkörper. In den Chromatophoren älterer erwachsener Thalli kann man bis zu 200 dieser etwa  $0,5 \mu$  großen Körperchen erkennen.

**Profilansicht:** Die Betrachtung der Profilansicht läßt die Chromatophorengestalt deutlich erkennen. Es handelt sich um ein sehr flaches, linsenförmiges Gebilde, das an den Seiten nahezu strichförmig ausgezogen ist (Tafelfig. 1). Im Zentrum des Chromatophors wird wiederum das beschriebene zusammengesetzte Pyrenoid sichtbar, um das sich in großer Zahl Stärkekörner lagern. Stärkekörner und Pyrenoidkörper erscheinen in der Profilansicht linsenförmig. Man erkennt gelegentlich unter günstigen Beobachtungsbedingungen eine regelmäßige Anordnung der Pyrenoidkörper innerhalb des Chromatophors.

Material, das unmittelbar nach der Entnahme vom Standort untersucht wird, zeigt regelmäßig den beschriebenen Chromatophorenbau. In den Kulturen wurde daher versucht, die Bedingungen so zu gestalten, daß die Chromatophorengestalt möglichst wenig von dieser Grundform abwich. Das ließ sich im gedämpften Licht des Versuchsgewächshauses unter gekalkten Fenstern erreichen.

#### Abweichungen von der normalen Chromatophorengestalt

Bei den Kulturversuchen zeigte sich, daß die Chromatophorengestalt weitgehend von den jeweils herrschenden Lichtbedingungen beeinflusst wird. Bei sehr starker Belichtung im stark besonnenen Gewächshaus tritt regelmäßig eine Kontraktion der Chromatophoren ein. Die in der Flächenansicht erkennbaren pseudopodienartigen Fortsätze werden eingezogen, der Durchmesser der Chromatophoren verringert sich und in der Profilansicht erkennt man statt dessen eine Vergrößerung der Höhe des Chromatophors. Die Pyrenoidkörper schließen sich zu einem sehr dichten Verband zusammen, so daß es sowohl in der Fläche als auch im Profil nur schlecht gelingt, die einzelnen das Pyrenoid aufbauenden Pyrenoidkörper zu erkennen. Der Stärkegehalt der Chromatophoren nimmt erheblich zu, so daß dieselben nach einiger Zeit vollkommen von Stärke erfüllt zu sein scheinen. Durch eine 3—4 Wochen lange Kultur im Dämmerlicht läßt sich jedoch jederzeit erreichen, daß die Chromatophoren wieder ihre gewohnte Gestalt annehmen.

Die beschriebene Kontraktion der Chromatophoren läßt sich auch unter dem Mikroskop verfolgen, wenn man aus einer unter normalen Bedingungen aufgewachsenen Kultur entnommene Thalli unter dem Mikroskop dem starken Licht der Mikroskopierlampe (völlig geöffnete Blende — keine Filter) aussetzt. Unter diesen Bedingungen kann man innerhalb von ca. 2 Stunden eine Verringerung des Chromatophorendurchmessers von anfänglich  $20 \mu$  auf  $12\text{--}15 \mu$  beobachten.



Kulturen, die über längere Zeit (1—2 Monate) im diffusen Dämmerlicht unter der Treibhaustablette gehalten wurden, zeigten starkes Etiolement. Die unter Normalbedingungen rosettenförmigen Thalli wurden sehr schmal und handförmig und ihre Spitzen richteten sich vom Substrat fort dem Licht entgegen (vgl. Proskauer 1948). Es trat dabei äußerst starke Rhizoidbildung ein. In diesen Thalli enthalten die während des Aufenthaltes im Dämmerlicht gebildeten Thallusabschnitte sehr flache und zart blaßgrün gefärbte Chromatophoren mit deutlich erkennbarem zusammengesetztem Pyrenoid. Die pseudopodienartigen Fortsätze des Chromatophorenrandes erstrecken sich dabei über die ganze Zelle und enthalten, abgesehen von gelegentlich vorhandenen Stärkekörnchen, keine lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Strukturen.

**Dunkelkulturen:** Da selbst nach längerer Kultur im diffusen Dämmerlicht die Chromatophoren noch in größerer Menge Stärke enthielten, wurden Kulturen von *Anthoceros laevis* in völliger Dunkelheit aufgezogen. Bereits nach wenigen Tagen beobachtet man, daß von der Peripherie des Chromatophors her beginnend allmählich die Stärke abgebaut wird. Nach einiger Zeit beginnen die Chromatophoren sodann vom Rande her ihre Grünfärbung zu verlieren. Es bildet sich eine immer breiter werdende, blaßgrün gefärbte periphere Zone. Schließlich ist nur noch das Pyrenoid von einem schmalen, grün gefärbten Saum umgeben. Während die peripheren Teile des Chromatophors allmählich ihren Stärkegehalt verlieren, findet man in der unmittelbaren Nähe des Pyrenoids noch nach Wochen eine große Zahl von Stärkekörnern vor. Die periphere, nahezu stärkefreie Zone des Chromatophors erscheint nun, abgesehen von winzigen Stärkekörnchen, die sich mit Jod-Jodkalium leicht als solche erkennen lassen, völlig homogen. Selbst mit bester Optik ist nicht die geringste Spur von Grana zu entdecken.

Werden Kulturen auf diesem Stadium wieder den normalen Belichtungsverhältnissen ausgesetzt, so setzt recht bald erneute Stärkebildung ein, und ausgehend vom Pyrenoid beginnen die Chromatophoren allmählich wieder zu ergrünen. Bereits nach 5—6 Tagen ist in der Regel die intensiv grüne Farbe der Chromatophoren wiederhergestellt. Der Stärkegehalt nimmt jedoch nur langsam zu. Erst nach etwa 3—4 Wochen haben die Chromatophoren wieder ihren ursprünglichen Stärkegehalt erreicht.

In langfristigen Dunkelkulturen (mehr als 5—8 Wochen) beginnen die Chromatophoren allmählich zu degenerieren. In den bereits vor Beginn der Dunkelkultur gebildeten Thallusabschnitten kommt es in den Chromatophoren zur Bildung kleiner Vakuolen, die vom Rande her fortschreitend allmählich den ganzen Chromatophor durchsetzen. Auch der zentrale Teil der Chromatophoren wird stärkefrei, das Chlorophyll wird weitgehend abgebaut und die Karotinoide verleihen der unmittelbaren Umgebung des Pyrenoids einen rötlichgelben Farbton. Die Pyrenoidkörper selbst sind intensiv rot gefärbt. Sie lösen sich allmählich aus dem Pyrenoidverband und verteilen sich über den ganzen zentralen Teil des Chromatophors. Der zunächst noch flach ausgebreitete Chromatophor rundet sich mehr und mehr ab und verliert erheblich an Größe (Volumen). Schließlich findet

man in den Zellen nur noch je ein 2–3  $\mu$  großes, mehr oder weniger kugeliges Gebilde, das, selbst noch schwach gelblich gefärbt, eine größere Zahl rot gefärbter Körperchen in sich birgt. Dieser in den ältesten Teilen des Thallus beginnende Vorgang greift allmählich auch auf die jüngeren Teile des Thallus über. Die Veränderungen sind irreversibel und führen schließlich zum Absterben der Thalli.

Im Gegensatz zu De Rezende-Pinto (1948) konnte in den zahlreichen durchgeführten Dunkelkulturen niemals das Auftreten von Grana in etiolierten *Anthoceros*-Chromatophoren beobachtet werden. Ob eventuell eine Verwechslung mit den in den Chromatophoren auftretenden Vakuolen oder mit den vom Pyrenoid her sich ausbreitenden Pyrenoidkörperchen vorliegt, läßt sich nicht beurteilen.

Chromatkulturen: Durch Zugabe von Chromaten zum Kulturmedium erzielte Lärz (1942) bei *Helodea canadensis* charakteristische Degenerationserscheinungen der Plastiden. Es lag daher nahe, auch die Wirkung von Chromaten auf die Chromatophoren von *Anthoceros laevis* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden ganze Thalli auf Leitungswasser kultiviert, dem  $K_2CrO_4$  bzw.  $K_2Cr_2O_7$  in der Konzentration von 0,5 g/100 cm<sup>3</sup> zugesetzt worden war. Bereits nach zwei Wochen beginnen unter diesen Bedingungen die Chromatophoren vom Rande her allmählich gelbgrün bis gelb zu werden. Nach drei bis vier Wochen hat sich die Gelbfärbung über den ganzen Chromatophor ausgebreitet, wobei insbesondere die Umgebung des Pyrenoids (wegen der dort erheblich größeren Schichtdicke) intensiv gelb gefärbt ist. Die Pyrenoidkörper sind rot gefärbt und verteilen sich über den zentralen Teil des Chromatophors. Die amöboiden Fortsätze des Chromatophors werden allmählich eingezogen, wobei der Chromatophor zugleich erheblich an Größe verliert. Schließlich findet man in jeder Zelle nur noch einen in lebhafter Brownscher Molekularbewegung befindlichen Körper in dessen Innerem man mehrere rot gefärbte Pyrenoidkörper wahrnehmen kann.

Streifenbildung: Bei Schädigung lebender Zellen durch Druck, Verletzung, Bestrahlung mit ultravioletter Licht oder mangelnde Luftzufuhr stellen sich charakteristische Deformationen der Chromatophoren ein. Diese zeigen in der Flächenansicht eine „krummradiale“ oder irisblendenartige Struktur, die den von Hofmeister (1867) nach Beobachtungen von Rosanoff bei *Bryopsis* beschriebenen Rosanoffschen Figuren entspricht. Die krummradiale Streifung nimmt ihren Ausgang unmittelbar am Pyrenoid und verläuft in geschwungener Linie bis zum Chromatophorenrand. Die Pyrenoidkörper und Stärkekörner verändern dabei ihre Lage im Chromatophor, indem sie durch Drehung um 90° nun ihre Profilansicht darbieten und sich im Sinne der krummradialen Streifung anordnen. Offensichtlich haben McAllister (1927) und Ma (1930) diese Stellung der Pyrenoidkörper und Stärkekörner als die normale Flächenansicht angesehen, weshalb sie in den Beschreibungen dieser Körper stets von „spindle-shaped bodies“ sprechen.

In der Profilansicht wird zur gleichen Zeit eine den ganzen Chromatophor in Längsrichtung durchziehende Streifung sichtbar. Diese ist in den

zentralen Teilen des Chromatophors besonders auffällig, und man kann hier eine deutliche, regelmäßig schichtweise Anordnung der Pyrenoidkörper und Stärkekörner im Sinne dieser Streifung erkennen. Zum Chromatophorenrand hin verliert sich die Streifung allmählich, indem sich hier die einzelnen Streifen so dicht zusammenlegen, daß sie nicht mehr mikroskopisch auflösbar sind.

Die beschriebenen streifigen Veränderungen der Chromatophoren sind in der Regel völlig reversibel. Unter normalen Kulturbedingungen wird innerhalb von 6 bis 8 Tagen die ursprüngliche Chromatophorengestalt wiederhergestellt.

Recht ähnliche Bilder erhält man auch in den anfänglichen Stadien einer Quellungsbehandlung mit 0,2 mol. KSCN-Lösung, die von Strugger (1947) zum Studium der Lamellarstruktur der Chloroplasten höherer Pflanzen angewandt wurde. Auch auf diese Weise werden in der Fläche die beschriebenen Rosanoffschen Figuren sichtbar. Die Deformation der Chromatophoren schreitet jedoch weiter fort, indem sich die krummradiale Streifung vergrößert. Im weiteren Verlauf der Quellung werden die Pyrenoidkörper stark auseinandergedrängt und zeigen selbst eine erhebliche Größenzunahme. Als besonders auffällige Erscheinung macht sich um das Pyrenoid herum eine meist nur noch blaßgrün gefärbte Zone bemerkbar, die sich zunehmend vergrößert. Tafelfig. 2 zeigt einen Chromatophor von *A. laevis* nach zweistündiger Behandlung mit 0,2 mol. KSCN. Die Anwendung der KSCN-Quellung ermöglicht selbst in Chromatophoren, deren Pyrenoidkörper sich zu einem sehr dichten Pyrenoidverband vereinigt haben, noch den Nachweis der zusammengesetzten Natur des Pyrenoids.

Die Profilansicht läßt ebenfalls eine Vergrößerung der Streifung erkennen. Die Behandlung mit KSCN bewirkt eine Quellung des ganzen Chromatophors, in dem jetzt die Lamellen weit bis in die Randzonen hinein zu verfolgen sind. Durch die verstärkte Quellung des Pyrenoids läßt sich nunmehr mit besonderer Deutlichkeit die Anordnung der Pyrenoidkörper auf den einzelnen Lamellen erkennen.

Um weitere Anhaltspunkte über den Ursprung der Streifung zu gewinnen, wurde in Parallelversuchen auch fixiertes Material einer Quellungsbehandlung unterworfen. Wegen ihrer einwandfrei strukturerhaltenden Wirkung fand die Fixation mit 2%iger Osmiumsäure bevorzugte Anwendung. Zarte Thalli oder Schnitte von denselben wurden durch 5 Minuten langes Einlegen in 2%ige Osmiumsäure oder entsprechend langes Räuchern mit Osmiumsäuredämpfen fixiert,  $\frac{1}{2}$  Stunde gewässert, dann einer 5 Minuten langen Quellungsbehandlung mit 0,5%iger KOH unterworfen und erneut gewässert. Diese von Strugger (1950) zum Studium der Lamellarstruktur an Chloroplasten höherer Pflanzen ausgearbeitete Methode führte auch bei *Anthoceros* zum Erfolg.

In der Profilansicht erkennt man eine Auflockerung der Lamellen, und es wird deutlich, daß die Pyrenoidkörper den Lamellen eingelagert sind. Auch außerhalb des Pyrenoids lassen sich die Lamellen noch ein Stück weit verfolgen. Sie vereinigen sich aber zum Chromatophorenrand hin zu so

dichten Lamellenpaketen, daß sich ihr Verlauf im einzelnen nicht mehr verfolgen läßt. Aus den Beobachtungen ergibt sich das in Abb. 1 dargestellte Schema für den Aufbau eines *Anthoceros*-Chromatophors. Die Ergebnisse decken sich vollkommen mit den von Menke (1940) gemachten Beobachtungen, die mit Hilfe des Ultraviolettmikroskops an Mikrotomschnitten gewonnen wurde. Die Regelmäßigkeit, mit der nach verschiedenster Behandlung der Chromatophoren immer wieder die gleiche Art der Streifung zustande kommt, zeigt sehr deutlich, daß es sich hier um den Ausdruck einer strukturellen Eigentümlichkeit der *Anthoceros*-Chromatophoren handelt.

Bei Betrachtung der Flächenansicht ergibt sich jedoch, daß nach der beschriebenen Fixation mit Osmiumsäure eine krummradiale Streifung nicht auftritt. Auch durch anschließende Quellungsbehandlung mit KOH läßt

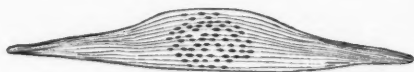


Abb. 1. Schematische Darstellung der Profilansicht eines Chromatophors von *Anthoceros laevis* nach Fixation mit 2%iger Osmiumsäure und vorsichtiger Quellung mit KOH.

sich eine solche Streifung nicht hervorrufen. Sie bleibt bei Verwendung anderer guter Fixationsmittel (Benda, Altmann, Champy) in der Regel ebenfalls aus. Es ist daraus ersichtlich, daß es sich bei der krummradialen Streifung nicht um den Ausdruck einer primär in den Chromatophoren vorgebildeten Struktur handelt. Auf keinen

Fall kann sie im Sinne von De Rezende-Pinto (1949) als Nachweis für einen schraubigen Aufbau (structure helicoidale) der *Anthoceros*-Chromatophoren angesehen werden. Die Beobachtungen lassen vielmehr darauf schließen, daß durch die Lageveränderung der Stärkekörner um 90° eine Auffaltung der Lamellenpakete des Chromatophors eintritt (vgl. Küster 1937, 1951).

#### Versuche zur Fixation und Färbung der Chromatophoren und Pyrenoide

Für entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen, insbesondere zur Beobachtung des Verhaltens der Pyrenoide während des Entwicklungszyklus, mußte verschiedentlich — wenigstens für Paralleluntersuchungen — fixiertes Material verwendet werden.

Die besten Fixationsergebnisse liefert in allen Fällen die Anwendung von 2%iger Osmiumsäure in flüssiger Form oder das Räucherverfahren mit Osmiumsäuredämpfen. Die Chromatophoren werden dadurch in ihrer natürlichen Form und Lage fixiert, wobei Fixationsartefakte selten oder gar nicht auftreten.

Alle anderen Fixationsmittel führen zu mehr oder weniger starken Deformationen der Chromatophoren, die sich bei deren verhältnismäßig großer Fläche recht kraß bemerkbar machen. Bendasches Gemisch bringt besonders an flachen, sehr stark ausgebreiteten Chromatophoren charakteristische Umklappungen des Chromatophorenrandes hervor, die sich in um

so mäßigeren Grenzen halten, je mehr sich die Chromatophorengestalt einer runden Scheibe nähert. Es dürfte sich hier um eine spezifische Wirkung der Chromsäure handeln, die in den Gemischen von Flemming, Altmann und Champy in gleicher Weise zutage tritt. Abgesehen von diesen Umklappungen erleiden die Chromatophoren nach Fixation in den genannten Gemischen nur geringfügige Veränderungen.

Chromsäure ohne weitere Zusätze führt zu den gleichen Umklappungen des Chromatophorenrandes, erzeugt darüber hinaus jedoch vakuolige Artefaktstrukturen.

Die Anwendung der Gemische von Carnoy, Regaud, Lewitzky sowie Formol (0,5–10%) und Alkohol (70%, 96% und absol.) führen zu völlig unzureichenden Fixationsbildern mit starken vakuoligen und streifigen Veränderungen, die nicht mehr als Äquivalent der lebenden Chromatophoren angesehen werden können.

Mit Osmiumsäure (oder osmiumsäurehaltigen Gemischen) gut fixiertes Material wurde über Alkoholstufen und Benzolstufen in Paraffin überführt. Die Schnittdicke der Mikrotomschnitte variierte zwischen 5 und 10  $\mu$ . Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte über die Alkoholreihe in aqua dest. überführt und von dort aus in die Farbstofflösungen (1:1000) gebracht. In den Präparaten zeigten die Pyrenoide eine starke Affinität zu basischen Farbstoffen. Mit Safranin, Neutralrot, Kristallviolett, Fuchsin, Rosanilin und Hämatoxylin lassen sich intensive Pyrenoidfärbungen erzielen. Die Grundsubstanz der Chromatophoren, das Stroma, erscheint je nach dem Grad der Differenzierung mehr oder weniger gefärbt.

Mehrfachfärbungen erlauben zwar eine Anfärbung von Pyrenoid und Stroma in verschiedenen Farben, sind jedoch, sofern nicht unter ständiger mikroskopischer Kontrolle gearbeitet wird, weniger geeignet, da die Farbwerte ineinander übergehen, was leicht zu Täuschungen Anlaß gibt. Es sei hier insbesondere auf die von Timberlake (1901, 1904) zum Studium der Pyrenoide angewandte Dreifachfärbung nach Flemming hingewiesen. Die Anwendung dieses Farbstoffgemisches führte Timberlake, McAllister (1914, 1927) und Ma (1928, 1930 a, b) zu der irrigen Ansicht, daß sich die Pyrenoidsubstanz unmittelbar in Stärke verwandeln könnte (vgl. Czurda 1929 und Küster 1951). Günstiger ist in jedem Falle die von Scherrer (1913, 1914) angewandte Färbung mit Kristallviolett und alizarinsulfosaurem Natrium.

Die beste Darstellungsmöglichkeit für die Pyrenoide bietet jedoch die Färbung mit Säurefuchsin nach Altmann (Romeis 1948), da sich Säurefuchsin durch eine überaus scharfe Differenzierbarkeit vor den meisten anderen Farbstoffen auszeichnet. Selbst in sehr stärkereichen Chromatophoren lassen sich mit dieser Methode die Pyrenoidkörper mit aller Deutlichkeit darstellen.

Soweit auf eine Paraffineinbettung, die stets noch zusätzliche Veränderungen der Chromatophorengestalt mit sich bringt, verzichtet werden mußte, kam vorzugsweise folgende Methode zur Anwendung:

Ganze Thalli oder Handschnitte von solchen werden 3–5 Minuten durch Räuchern mit Osmiumsäuredämpfen fixiert,  $\frac{1}{2}$  Stunde gewässert, dann



20 Minuten in einer Säurefuchsinlösung 1 : 500 (Phosphatpuffer pH 4,3) gefärbt und in einer Pufferlösung vom gleichen pH-Wert untersucht. Ergebnis: Pyrenoidkörper intensiv rot, Chromatophoren grün (Chlorophyll), Kerne zart rosa, Nukleolen intensiv rot. Die Färbung läßt sich durch Nachbehandlung mit einer 1%igen wäßrigen Lösung von  $\text{SnCl}_2$  für einige Zeit haltbar machen (Farblackbildung). Durch den Abbau des Chlorophylls verlieren die Präparate allerdings allmählich an Schärfe.

Bei allen Färberversuchen zeigte sich eine auffallende Parallelität im färberischen Verhalten von Pyrenoid und Nukleolus. In Farbstoffgemischen kann diese Parallelität gelegentlich undeutlich sein, wodurch die entgegengesetzte Ansicht Scherrers verständlich wird. Die Parallelität im Verhalten gegenüber verschiedensten Farbstoffen läßt eine stoffliche Verwandtschaft der beiden genannten Körper vermuten.

Einen weiteren Hinweis gibt das gleichartige Verhalten von Pyrenoiden und Nukleolen bei der Hydrolyse mit HCl:

Alkoholfixierte Mikrotomschnitte von *Anthoceros laevis* wurden nach dem Entparaffinieren in Wasser überführt und sodann einer Hydrolyse mit  $n$  HCl bei 58–60° C (7–15 Min.) unterworfen und sodann in fließendem Wasser gründlich ausgewaschen. Es zeigte sich, daß nach dieser Behandlung die Nukleoli als auch die Pyrenoide in gleicher Weise ihre Affinität zu basischen Farbstoffen (Pyronin, Safranin, Toluidinblau, Hämatoxylin) verlieren. Nach Vendrely-Randavel (1949) kann dieses Ergebnis — wenn auch mit gewisser Vorsicht — als ein Hinweis auf das Vorhandensein von Ribonukleinsäure in den Pyrenoiden von *Anthoceros laevis* angesehen werden. Weitere Untersuchungen sollen an dieser Stelle ansetzen, um die cytochemische Natur der Pyrenoide einer Klärung näherzubringen.

#### Das Verhalten der Pyrenoide im Entwicklungszyklus

Mit Hilfe der beschriebenen Säurefuchsinmethode bereitete der Nachweis kleinster, isolierter Pyrenoidkörper selbst in weitgehend mit Stärke erfüllten Chromatophoren keinerlei Schwierigkeiten. Sie leistete wertvollste Dienste beim Studium der Pyrenoide im Entwicklungszyklus.

Junge Keimstadien ließen sich leicht durch Aussaat von *Anthoceros*-Sporen auf Mineralsalzagar mit der von Rink (1936) angegebenen Nährlösung erhalten. Auf diesem Substrat keimten die ersten Sporen bereits 5–6 Tage nach der Aussaat. Tafel I, Fig. 4, stellt einen 15 Tage alten, inzwischen bereits mehrzelligen Thallus dar. Schon die ersten Zellen enthalten jeweils einen meist linsenförmigen Chromatophor, der deutlich grün gefärbt ist. Etwa 6–8 Pyrenoidkörper sind — ohne einen zusammenhängenden Pyrenoidkomplex zu bilden — über den ganzen Chromatophor verteilt. Auch in den Scheitelzellen erwachsener Thalli enthalten die Chromatophoren nur eine kleinere Zahl von 10 bis 15 Pyrenoidkörpern in recht lockerem Verband, während die Chromatophoren in erwachsenen Zellen des vegetativen Thallus bis zu 200 Pyrenoidkörper enthalten können, die sich zu einem dichtgefügt Pyrenoid zusammenschließen. Bei der Entwicklung der Geschlechtsorgane tritt eine starke Reduktion der Chromatophorengroße



ein, wobei die Zahl der Pyrenoidkörper stark herabgesetzt wird, so daß in den Eizellen der Chromatophor nur noch 6–12 Pyrenoidkörper enthält. Etwa die gleiche Zahl findet man auch in den Zellen eines jungen Sporogons sowie in den Zellen der basalen Wachstumszone älterer Sporogone. Im Archespor tritt bei der weiteren Entwicklung nur eine geringfügige Vermehrung ein. Es lassen sich hier 15–20 Pyrenoidkörper nachweisen. Während aber im Gametophyten die Pyrenoidkörper zu einem mehr oder weniger eng zusammengeschlossenen Pyrenoid in der Mitte des Chromatophors vereinigt sind, zeigt sich im Archespor eine gewisse Tendenz zur Auflösung des Pyrenoidverbandes. Diese Erscheinung wird in den in der Kolumella und in der Sporogonwand auftretenden „Chlorophyllketten“ (Scherrer 1914) besonders deutlich. Dabei kommt es nicht selten vor, daß in einzelnen Chromatophorenteilen die Pyrenoidkörper noch ein einigermaßen umrissenes Pyrenoid bilden, während sie an anderen Stellen völlig ohne Zusammenhang über den ganzen Chromatophor verstreut sind (Abb. 2). In den Elatern, wo sich die Teilchromatophoren schließlich völlig voneinander trennen und nicht mehr durch Stromabrücken miteinander verbunden sind, findet man niemals mehr ein geschlossenes Pyrenoid, sondern nur noch einzeln in den Chromatophoren liegende Pyrenoidkörper.



Abb. 2. „Chlorophyllkette“ aus der Kolumella von *Anthoceros laevis*. Bei a sind die Pyrenoidkörper zum Pyrenoid vereinigt, bei b über den Chromatophor verstreut. (Nach einem mit Osmiumsäure fixierten und mit Säurefuchsin gefärbten Präparat.)

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichtet De Lemos-Pereira (1953) über das Vorkommen von Grana und das Vorhandensein eines Chloroplastonemas in den Chloroplasten des *Anthoceros*-Sporophyten. Die recht unzureichende Technik (Schabepreparate wurden in destilliertem Wasser beobachtet!) führt zu starken Artefaktbildungen. Von den nach sorgfältiger Präparation stets sichtbaren Pyrenoidkörpern ist nicht die Rede und auch in den Mikrophographien sind diese nicht zu entdecken. Die Mikrophographien erlauben keinerlei Rückschlüsse auf eine a priori in den Chloroplasten enthaltene Struktur.

Die große Regelmäßigkeit, mit der die Pyrenoide bzw. Pyrenoidkörper auf allen Stadien des Entwicklungszyklus von *Anthoceros* nachweisbar sind, gibt Anlaß, nach ihrem Verhalten bei der Chromatophorenteilung zu fragen. Bereits Scherrer (1914) hatte die Teilung der Chromatophoren von *Anthoceros Husnoti* an Hand von fixierten Präparaten beschrieben und dabei festgestellt, daß sich die Pyrenoide bei der Chromatophorenteilung regelmäßig auf die Tochterchromatophoren verteilen. Eigene Untersuchungen wurden an lebendem Material durchgeführt. Eine bevorstehende Chromatophorenteilung erkennt man bei einiger Übung bereits daran, daß sich der Chromatophor ein wenig abrundet und die bisher sehr dicht gelagerten Pyrenoidkörper ein wenig auseinanderweichen, wodurch sie er-

hebt sich deutlich sichtbar werden (Abb. 3 a, b). Bald darauf streckt sich das Pyrenoid senkrecht zur Teilungsebene des Chromatophors und wenig später erkennt man nahezu gleichzeitig am Chromatophor und am Pyrenoid die beginnende Einschnürung (c). Die Tochterpyrenoide entfernen sich bei fortschreitender Teilung langsam voneinander, so daß bald nur noch wenige Pyrenoidkörper in der Stromabrücke zwischen den beiden Tochterchromatophoren liegen (d). Kurz vor der endgültigen Trennung der Tochterchromatophoren sind die beiden Tochterpyrenoide völlig voneinander getrennt (e), sie beginnen allmählich sich wieder abzurunden. Sie nehmen bald nach dem Zerreißen der Stromabrücke ihre zentrale Lage im Chromatophor wieder ein und schließen sich zu einem engen Pyrenoidverband zusammen. Es besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen Kern- und Chromatophorenteilung, indem die Chromatophorenteilung stets während der Prophase der Kernteilung einsetzt (Scherrer 1915, 1914; Lander

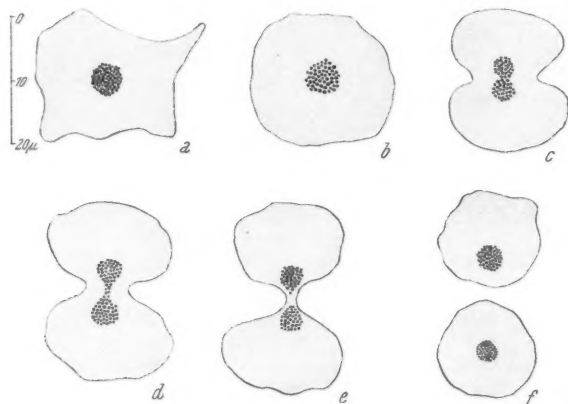


Abb. 5. Einzelne Stadien der Chromatophoren- und Pyrenoidteilung von *Anthoceros laevis* nach Beobachtungen an lebendem Material. Erläuterung im Text.

1956; Heitz 1942). In der Zeit zwischen den Zellteilungen tritt eine starke Vermehrung der Pyrenoidkörper ein, so daß deren Zahl innerhalb enger Grenzen konstant bleibt. Einzelheiten über die Vermehrung der Pyrenoidkörper selbst ließen sich nicht beobachten, es treten jedoch unmittelbar nach der Chromatophorenteilung in den Tochterpyrenoiden starke Größenunterschiede der Pyrenoidkörper auf, die mit dem Erreichen der endgültigen Zahl von Pyrenoidkörpern wieder verschwinden. Es erscheint daher nicht ausgeschlossen, daß auch die Pyrenoidkörper selbst zur Vermehrung durch Teilung befähigt sind. Durch das Verhalten gegenüber basischen Farbstoffen nach HCL-Hydrolyse wird diese Annahme noch wahrscheinlicher. Es liegt daher nahe, in den Pyrenoidkörpern der Anthocerotales identisch reproduzierbare Strukturen zu vermuten, die ein den Chromatophoren eigenes Steuerungssystem darstellen.

## Untersuchungen an anderen Vertretern der Anthocerotales

Zum Vergleich wurden einige weitere Vertreter der Anthocerotales herangezogen<sup>1</sup>. Bei *Anthoceros punctatus*, *Anthoceros crispulus*, *Anthoceros Husnoti*, *Anthoceros pseudolaevis*, *Anthoceros glandulosus* und *Dendroceros spec.* ergaben sich gegenüber *Anthoceros laevis* nur graduelle Unterschiede, die sich auf die Größe der Chromatophoren, die Zahl der Pyrenoidkörper und deren mehr oder weniger engen Zusammenschluß erstreckten. Grana wurden bei keiner der genannten Arten gefunden.

Eine Sonderstellung nimmt lediglich die von Campbell (1906, 1907) aufgestellte Gattung *Megaceros* ein. Während für alle anderen *Anthocero-*

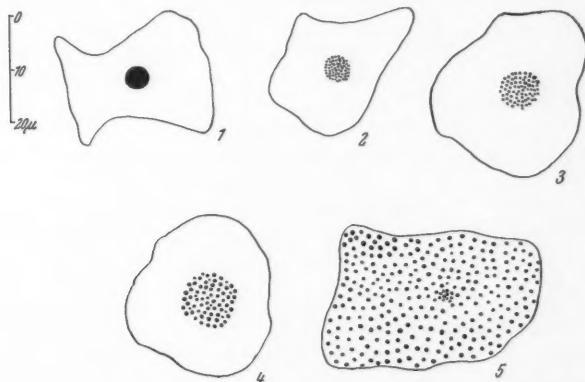


Abb. 4. Vergleichende Darstellung der Chromatophoren verschiedener *Anthocerotales*: 1. *Nothotylas valvata*; 2. *Anthoceros laevis*; 3. *Dendroceros spec.*; 4. *Anthoceros Husnoti*; 5. *Megaceros tjibodensis*. Die Abbildung veranschaulicht die fortschreitende Auflockerung des Pyrenoidverbandes. (Zeichnungen nach Dauerpräparaten — Osmiumsäurefixation und anschließende Färbung mit Säurefuchsin.)

*tales* das Vorkommen von nur einem Chromatophor in jeder Zelle charakteristisch ist, findet man bei *Megaceros tjibodensis* in der obersten Zellschicht stets zwei, und im Innern des Thallusgewebes kann ihre Zahl auf acht bis zwölf, dafür aber kleinere Chromatophoren steigen. Eine weitere Eigenart ist das Fehlen des Pyrenoids in den Chromatophoren von *Megaceros*-Arten.

Bei der Untersuchung lebender Chromatophoren zeigte sich, daß dieselben eine Vielzahl kleiner, linsenförmiger Körperchen enthalten, die regelmäßig über den ganzen Chromatophor verstreut sind. Nur vereinzelt

<sup>1</sup> Für freundliche Unterstützung bei der Beschaffung des Materials bin ich der Verwaltung des Botanischen Gartens Buitenzorg, Herrn Professor Dr. J. Proskauer, Berkeley, Calif., Herrn Dr. W. Meijer, Amsterdam, Herrn Dr. K. Müller, Freiburg, Herrn Dr. G. Buchloh, Heidelberg, Herrn A. Bröcker, Ostfelden (Westf.), und Frl. D. Praus, Rütten, zu großem Dank verpflichtet.

findet man außerdem noch eine kleine Gruppe solcher Körperchen im Zentrum des Chromatophors. Das läßt sich besonders häufig in den Zellen im Innern des Thallusgewebes beobachten. Mit Hilfe der beschriebenen Säurefuchsinmethode lassen sich diese Körperchen intensiv rot anfärben, wodurch sie deutlich von den ebenfalls im ganzen Chromatophor vorhandenen Stärkekörnern unterschieden sind. Ihrem Verhalten nach müssen sie somit als Pyrenoidkörper gedeutet werden, die sich hier nicht zu einem Pyrenoid vereinigen, sondern sich über den ganzen Chromatophor ausbreiten. Diese Erscheinung, die bei anderen *Anthocerotales* nur in begrenzten Teilen des Sporophyten zur Ausbildung kommt, greift bei *Megaceros* also auch auf den Gametophyten über (Tafel I, Fig. 5).

In extremem Gegensatz zu *Megaceros* steht *Nothotylas valvata*. Hier findet man in lebendem und fixiertem Material ein völlig kompaktes und homogenes Pyrenoid (Tafel I, Fig. 6). Selbst nach Quellungsbehandlung und unter besten optischen Bedingungen erscheinen hier die Pyrenoide völlig homogen und sind dadurch in ihrem Bau durchaus mit den Pyrenoiden der Algen (*Spirogyra*, *Mougeotia*, *Hydrodictyon* u. a.) zu vergleichen.

Zwischen diesen beiden Extremen, *Nothotylas* mit seinen homogenen, kompakten Pyrenoiden und *Megaceros*, dessen Pyrenoide völlig in einzelne Pyrenoidkörper aufgelöst sind, die sich regelmäßig über die ganze Chromatophorenfläche verteilen, lassen sich die anderen untersuchten

#### Tafel I.

Fig. 1. Zwei Zellen aus einem lebenden Thallus von *Anthoceros laevis*. In der oberen Zelle ein Chromatophor in Flächenstellung, in der unteren in Profilstellung. Man erkennt das sehr dicht gefügte Pyrenoid und die dasselbe umlagernden Stärkekörner. (Vergr. 1000 : 1.)

Fig. 2. Durch zweistündige Quellung in 0,2 m KSCN-Lösung deformierter Chromatophor von *Anthoceros laevis*. Die Pyrenoidkörper sind durch die Quellung weit auseinandergerückt und daher sehr deutlich zu erkennen. Die das Pyrenoid umgebende helle Zone entstand durch die Verquellung der Stärke. Das Stroma des Chromatophors zeigt eine den Rosanoffschen Figuren entsprechende Streifung. (Vergr. 3000 : 1.)

Fig. 5. Durch Druck reversibel geschädigter Chromatophor von *Anthoceros laevis*. Die Stärkekörner sind um 90° gekippt, das Stroma zeigt eine an die Rosanoffschen Figuren erinnernde Streifung.

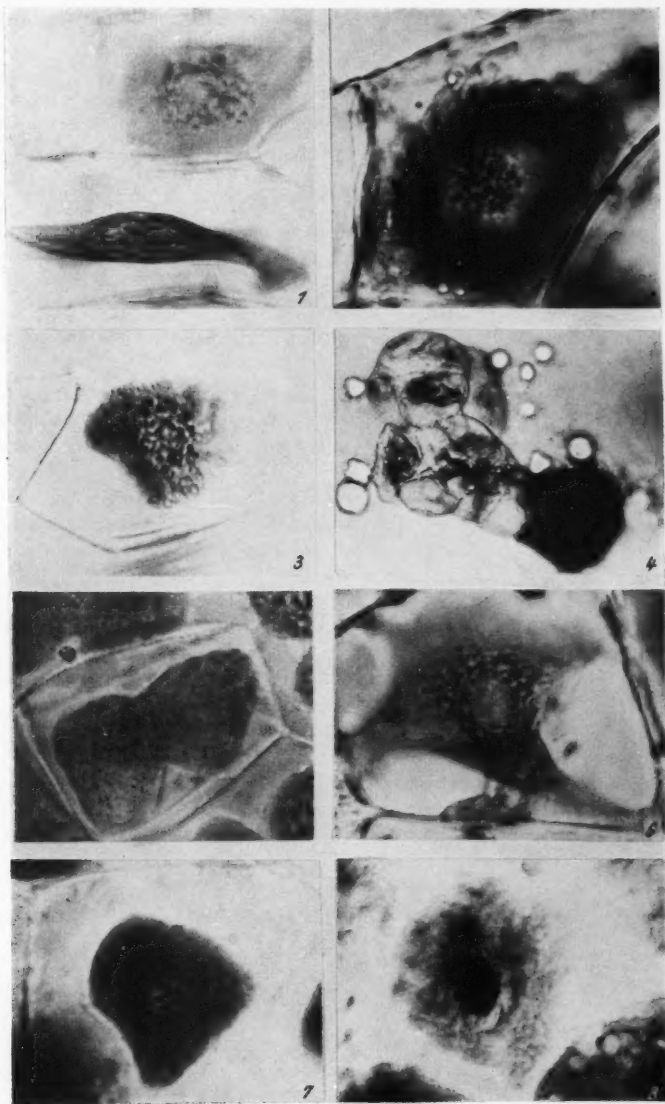
Fig. 4. Lebendes, mehrzelliges Keimstadium von *Antoceros punctatus* 15 Tage nach der Aussaat. (Vergr. 500 : 1.)

Fig. 5. Lebender Chromatophor aus dem Thallus von *Megaceros tjibodensis*. Die Pyrenoidkörper sind über den ganzen Chromatophor verteilt. (Vergr. 1500 : 1.)

Fig. 6. Lebender Chromatophor von *Nothotylas valvata*. Das homogene Pyrenoid ist von zahlreichen kleinen Stärkekörnern umgeben. (Vergr. 1500 : 1.)

Fig. 7. Lebender Chromatophor aus dem Thallus von *Anthoceros laevis* mit zusammengesetztem Pyrenoid und umliegenden Stärkekörnern. (Vergr. 1500 : 1.)

Fig. 8. Chromatophor von *Anthoceros laevis* nach Fixation mit Osmiumsäure und Färbung mit Säurefuchsin. Die intensiv gefärbten Pyrenoidkörper sind deutlich zu erkennen. (Vergr. 2000 : 1.)



Tafel I.

*Anthocerotales* entsprechend ihrer zunehmenden Tendenz zur Auflockerung des Pyrenoidverbandes wie folgt einordnen: *Nothotylas valvata*, *Anthoceros laevis*, *Anthoceros pseudolaevis*, *Anthoceros vesiculosus*, *Anthoceros glandulosus*, *Dendroceros spec.*, *Anthoceros punctatus*, *Anthoceros*

*crispulus*, *Anthoceros Husnoti*, *Megaceros tjibodensis* (Abb. 4 und Tafel I, Fig. 5—8).

Es liegt hier offenbar eine phylogenetische Reihe vor, die unter Berücksichtigung der exponierten Stellung der *Anthocerotales* (vgl. Campbell 1926) für die Erforschung der Phylogenie der Chromatophoren eine erhebliche Bedeutung erlangen kann.

### Diskussion

Bereits Schmitz (1882) hat in seiner Arbeit über die Chromatophoren der Algen den Pyrenoiden ein umfangreiches Kapitel gewidmet. Durch spätere Arbeiten von Chmielewsky (1889), Geitler (1926), Pascher (1927), Czurda (1929) und Chadeffaud (1942) wurden die Kenntnisse über die Pyrenoide erheblich erweitert. Trotz vielfacher Bemühungen wissen wir aber über ihre Funktion nur wenig. Auch die Frage von Schmitz (1882), „sind dieselben im Laufe der Entwicklungsgeschichte verlorengegangen oder sind dieselben bei Phanerogamen und Archegoniaten in irgendeiner bisher unerkannten feineren Verteilung doch noch vorhanden?“ ist bisher unbeantwortet geblieben.

Die für die *Anthocerotales* aufgestellte Entwicklungsreihe scheint hier einen Hinweis zu geben. Die Chromatophoren von *Nothotylas*, dem Anfangsglied dieser Reihe, gleichen weitgehend den von vielen Algen bekannten Chromatophoren mit homogenen Pyrenoiden. Über verschiedene Zwischenstufen führt die Entwicklung bei den *Anthocerotales* zu *Megaceros*. Die extreme Auflockerung des Pyrenoidverbandes führt hier zu einer Struktur, die morphologisch durchaus den Grana in den Plastiden der höheren Pflanzen entspricht. Bei Pyrenoidkörpern und Grana handelt es sich um kleine, linsenförmige Körper, die dem Lamellensystem der Chromatophoren eingelagert sind. Beide besitzen eine starke Affinität zu basischen Farbstoffen. Die Fähigkeit der Grana zur identischen Reproduktion ist durch Strugger (1951, 1953) erwiesen und ist nach den vorstehenden Untersuchungen auch für die Pyrenoidkörper der *Anthocerotales* sehr wahrscheinlich. Wie die Grana in den Chloroplasten der höheren Pflanzen dürften somit auch die Pyrenoide ein den Chromatophoren eigenes Steuerungssystem darstellen. Die Grana sind nach Strugger (1951) der Ort der Photosynthese. In ihnen ist das Chlorophyll lokalisiert. Darin liegt ein erheblicher Unterschied zwischen Grana und Pyrenoidkörpern: Die Pyrenoidkörper enthalten kein Chlorophyll. Ob ihnen neben der Fähigkeit zur Stärkekondensation noch weitere Aufgaben bei der Photosynthese zufallen, bleibt noch festzustellen.

Als Arbeitshypothese soll angenommen werden, daß es sich bei der Chromatophorenreihe der *Anthocerotales* um die endgültige Verwirklichung eines bereits bei den Algen eingeleiteten Prinzips handelt. Die Chromatophoren und Pyrenoide unterliegen einer fortschreitenden Aufteilung in kleinere Einheiten, die im Sinne einer Vergrößerung der aktiven Oberfläche gedeutet werden kann. Wie weit tatsächlich die Analogien zwischen Pyrenoidkörpern und Grana reichen, wird jedoch durch umfangreiche weitere, vor allem cytochemische Untersuchungen zu prüfen sein.



### Zusammenfassung der Ergebnisse

1. In den großen, pyrenoidführenden Chromatophoren von *Anthoceros* lassen sich weder in lebendem noch in fixiertem Material Grana nachweisen.

2. Durch Quellungsbehandlung fixierter Chromatophoren mit KOH läßt sich der lamellare Aufbau der Chromatophoren sichtbar machen.

3. Das Pyrenoid der *Anthoceros-Chromatophoren* besteht aus vielen Pyrenoidkörpern von linsenförmiger Gestalt, die dem Lamellensystem eingelagert sind. Die Darstellung der Pyrenoide (Pyrenoidkörper) gelingt besonders gut nach Fixation mit  $\text{OsO}_4$  und anschließender Färbung in einer Säurefuchsinlösung 1 : 500 ( $\text{pH} = 4,5$ ).

4. Die Pyrenoidkörper sind auf allen Stadien des Entwicklungszyklus mit größter Konstanz zu finden. Ihre Vermehrung durch Teilung ist sehr wahrscheinlich. Die Zahl der Pyrenoidkörper kann in Zellen mit großer Teilungsaktivität auf sechs bis acht sinken (Scheitelzellen des Thallus), während sie in älteren Zellen bis zu 200 beträgt. Auf bestimmten Stadien des Entwicklungszyklus neigen die Pyrenoidkörper dazu, sich aus dem Pyrenoidverband zu lösen und sich über den ganzen Chromatophor zu verteilen.

5. Der Vergleich verschiedener *Anthocerotales* läßt eine Entwicklungsreihe erkennen, die von nicht zusammengesetzten homogenen Pyrenoiden (*Nothotylas*) über zusammengesetzte Pyrenoide mit mehr oder weniger engem Pyrenoidverband (*Anthoceros*, *Dendroceros*) zur völligen Auflösung des Pyrenoids in einzelne, nicht zu einem Pyrenoid vereinigte Pyrenoidkörper (*Megaceros tjibodensis*) führt.

### Literatur

- McAllister, F., 1914: The Pyrenoid of *Anthoceros*. Amer. J. Bot. 1, 79.  
 — 1927: The pyrenoids of *Anthoceros* and *Nothotylas* with special reference to their presence in the spore mother-cells. Amer. J. Bot. 14, 246.  
 Bartlett, E. M., 1928: A comparative study of the sporophyte in the *Anthocerotaceae* with special reference to the genus *Anthoceros*. Ann. Bot. 42, 409.  
 Bose, S. R., 1941: Function of pyrenoids in Algae. Nature (London) 148, 440.  
 Campbell, D. H., 1906: Multiple chromatophors in *Anthoceros*. Ann. Bot. 20, 322.  
 — 1907: Studies on some Javanese *Anthocerotaceae*. Ann. Bot. 21, 467.  
 — 1918: The structure and development of mosses and ferns. 3. Aufl. New York.  
 — 1925: The relationships of the *Anthocerotaceae*. Flora 118/119, 62.  
 Chadeffaud, M., 1941: Les pyrenoides des Algues et l'existence chez ces végétaux d'un appareil cinétique intraplastidial. Ann. Sc. nat. bot. 11, 2.  
 Chmielevsky, V. F., 1899: Die Pyrenoide. Ref. Bot. Zbl. 77, 108.  
 Czurda, V., 1929: Morphologie und Physiologie des Algenstärkekornes. Beih. Bot. Zbl. 45, 97—270.  
 Geitler, L., 1926: Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pyrenoide. Arch. Protistenk. 56, 128.  
 — 1937: Über den Granabau der Plastiden. Planta 26, 465.  
 Heitz, E., 1942: Lebendbeobachtung der Zellteilung bei *Anthoceros* und *Hymenophyllum*. Ber. dtsch. bot. Ges. 60, 28.

- Hygen, G., 1937: Über den Granabau der *Micrasterias*-Plastiden. *Planta* 27, 379.
- Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur bei den Moosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 67, 93.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Pflanzenzelle. 2. Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographien* 15. Berlin.
- 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl., Jena 1951.
- Lander, C. A., 1935: Relation of the plastid to nuclear division in *Anthoceros laevis*. *Amer. J. Bot.* 22, 42.
- Ma, R. M., 1928: The chloroplasts of *Isoetes melanopoda*. *Amer. J. Bot.* 15, 277.
- 1930 a: The chloroplasts of *Selaginella*. *Bull. Torrey Bot. Club* 57, 277.
- 1930 b: Starch deposition in the sporogenous cells of certain mosses. *Bull. Torrey Bot. Club* 57, 525.
- Lorbeer, G. S., 1924: Das Chromatophor, die Chromosomenzahl und die Dehiscenzlinie des Sporogons von *Anthoceros laevis*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 42, 231.
- Menke, W., und F. Koydl, 1939: Direkter Nachweis des lamellaren Feinbaus der Chloroplasten. *Naturwiss.* 29, 158.
- 1940: Die Lamellarstruktur der Chloroplasten im ultravioletten Licht. *Naturwiss.* 28, 158.
- Pinnik, A. A., 1925: On the number of chloroplasts in the cells of *Anthoceros laevis*. *Bull. Torrey Bot. Club* 52, 515.
- Proskauer, J., 1948: Studies on the morphology of *Anthoceros*. I. *Annals of Botany N. S.* 12, 237; II. *Annals of Botany N. S.* 12, 427.
- De Rezende-Pinto, M. C., 1948: Sur la structure granulaire des chloroplastes de *Anthoceros laevis*. *Portug. Acta Biol. (A)* 2, 115.
- 1949: Sur la structure helicoidale des chloroplastes de *Anthoceros laevis*. *Portug. Acta Biol. (A)* 2, 367.
- Rink, W., 1936: Zur Entwicklungsgeschichte, Physiologie und Genetik der Lebermoosgattungen *Anthoceros* und *Aspiromitus*. *Flora* 50, 87.
- Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München 1948.
- Steinecke, Fr., und H. Ziegenspeck, 1928: Veränderungen im Pyrenoid während der Stärkeproduktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 46, 678.
- Scherrer, A., 1915: Die Chromatophoren und Chondriosomen von *Anthoceros* (vorl. Mitt.). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 51, 493.
- 1914: Untersuchungen über Bau und Vermehrung der Chromatophoren und das Vorkommen von Chondriosomen bei *Anthoceros*. *Flora* 107, 1.
- Schimper, A. W. F., 1882: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.* 41, 105.
- Schmitz, Fr., 1883: Die Chromatophoren der Algen. *Verh. Naturhist. Verein preuß. Rheinl. u. Westf.* 40, 1883.
- Strugger, S., 1947: Die Anwendung des Phasenkontrastmikroskopes zum Studium der Pflanzenzelle. *Z. Naturf.* 2 b, 146.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl., Heidelberg.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturw.* 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 64, 69.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* 43, 120.
- Timberlake, H. G., 1901: Starch formation in *Hydrodictyon utriculatum*. *Ann. Bot.* 15, 619.
- 1904: The nature and function of the pyrenoid. *Science, N. S.* 17, 460.

- Weber, F., 1936: Doppelbrechung der Chloroplasten von *Anthoceros*. *Protoplasma* 26, 312.  
Weier, T. E., 1937: On the structure of the *Anthoceros*-plastid in reflected light. *Science* 78, 264.  
Wieler, A., 1936: Über den Bau der Chlorophyllkörner. *Protoplasma* 26, 295.  
Zimmermann, A., 1892: Die botanische Mikrotechnik. Tübingen 1892.

Meinem hochverehrten Lehrer Herrn Professor Dr. S. Strugger bin ich für die ständige hilfsbereite Förderung und Unterstützung meiner Arbeit zu größtem Dank verpflichtet.

Anmerkung bei der Korrektur:

Durch elektronenoptische Untersuchungen an Pyrenoiden von *Spirogyra Closterium*, *Enteromorpha* und *Mougeotia* kommt H. Leyon, 1954 (*Exp. Cell Research* 6, 497—505) zu Ergebnissen, welche die in der vorliegenden Arbeit und H. K a j a, Diss. Münster 1953, vertretenen Ansichten über die Beziehungen zwischen Grana und Pyrenoiden durchaus bekräftigen.

# The Effect of N-Ethylmaleimide on the Fertilization of the Sea Urchin Egg

By

Berndt Hagström and John Runnström

The Wenner-Gren Institute of exp. Biology, University of Stockholm, Sweden

With 6 Figures

(Received April 15, 1954)

The effect of several SH-reagents on the fertilization of the sea urchin egg has previously been described (8). It was obvious that even comparatively high concentrations of reagents like iodoacetamide, para-chloro-mercuribenzoate and iodosobenzoate allowed the attachment of the spermatozoon, and the evolution of the first steps in the cortical changes. The ensuing processes, as penetration to the centre and copulation of pronuclei, cleavage etc. were more affected than the first steps in fertilization. The previous studies will be supplemented in this paper by some observations on the effect of N-ethylmaleimide (abbreviated below: N-EMI).

## Methods

The sea urchins used in this research were *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* (Naples) and *Psammochinus miliaris* (Kristineberg, Swedish West Coast). The ovaries were removed from the females and transferred to a piece of bolting silk through which the eggs, pouring out from the ovaries, were sieved. One drop of "dry sperm" was suspended in 5 ml. sea water. One drop of this suspension was used for the fertilization of one or two ml. egg suspension. A sample of N-EMI was kindly provided by Dr. K. Bailey. A stock solution of N-EMI was prepared in sea water or redistilled water. The pH of the solutions was controlled by a Beckman pH-meter with glasselectrode.

## Experimental

Effect of N-EMI on eggs and sperm of *Arbacia lixula*

Unfertilized eggs of *Arbacia lixula* (Naples, June 1953) were transferred to the following media:

- a) 1 ml. sea water.
- b)  $10^{-3}$  M N-EMI in sea water.
- c)  $10^{-4}$  M N-EMI in sea water.

After 6 minutes the eggs were inseminated and after further 5–6 minutes the following observations were made:

- a) 100 per cent fertilization, with adhering membranes,
- b) 2 per cent fertilization, with adhering refractile membranes.
- c) Almost 100 per cent fertilization with adhering membranes or hyaline protrusions (Fig. 2–4).

Cleavage occurred only in a).

In a parallel series the media contained also extract from the granular fraction of homogenates of *Arbacia* eggs [2, 9]. The original extract was diluted 1:10 with sea water (a<sup>1</sup>) or sea water with  $10^{-3}$  M (b<sup>1</sup>) or  $10^{-4}$  M (c<sup>1</sup>) N-EMI. N-content in the media a<sup>1</sup>) to c<sup>1</sup>) 110  $\mu$ g. per ml. After 8–10 minutes the following observations were made:

- a<sup>1</sup>) 100 per cent fertilization with an elevated refractile membrane.
- b<sup>1</sup>) About 10 per cent fertilization. In the fertilized eggs the membrane was elevated, sometime with hyaline protrusions below the membrane.
- c<sup>1</sup>) About 98 per cent fertilization. Membrane elevated; in some eggs hyaline protrusions below the membrane.

Cleavage occurred only in a<sup>1</sup>); the structure of both unfertilized and fertilized eggs grew coarser in b<sup>1</sup>) and c<sup>1</sup>).

In presence of N-EMI the spermatozoa lose their motility. Spermatozoa of twice the concentration used in the preceding experiment were suspended in:

- a) 1 ml. sea water.
- b) 1 ml. N-EMI  $10^{-3}$  M in sea water.
- c) 1 ml. N-EMI  $5 \times 10^{-4}$  M in sea water.
- d) 1 ml. N-EMI  $10^{-4}$  M in sea water.

Within 1–2 minutes a decrease in motility was obvious in b), c) and d). After 3–4 minutes no mobile spermatozoa were present in b) and c). After 5 minutes the motility had decreased in d), but jerking movements were still observed. The movement in a) are still lively. After 6 minutes a drop of egg suspension was added to each of the media a–d). Fertilization occurred in a) and d) but not in b) and c).

To avoid the direct effect of N-EMI on the spermatozoa, the eggs were pretreated in the unfertilized state with the reagent, and then after two washings transferred to normal sea water where insemination occurred. In one experiment with the same egg material (*Arbacia lixula*) as that used in the preceding experiment, two different concentrations of N-EMI in sea water were used,  $10^{-3}$  M (a) and  $2 \times 10^{-4}$  M (b). The eggs were washed and transferred to pure sea water after 5, 15 and 30 minutes exposure to the N-EMI. Insemination occurred 7 minutes after the transfer.

The following observations were made:

#### I. Pretreatment for 5 minutes:

- a) No immediate fertilization but in the course of 30 minutes an in-

creasing number of eggs have formed hyaline protrusions (polyspermic fertilization).

b) 100 per cent fertilization. There was a tendency for membrane elevation but no real separation of the membrane occurred. At most local blisters appeared.

II. Pretreatment for 15 minutes:

a) No fertilization.

b) 100 per cent fertilization; in a number of eggs (~ 15 per cent) hyaline protrusions as in I a).

III. Pretreatment for 30 minutes:

a) No fertilization.

b) 100 per cent fertilization, eggs with hyaline protrusions more numerous than in II b).

In a parallel untreated control 100 per cent of the eggs were fertilized upon insemination. The membranes adhered to the egg surface. The control eggs cleaved, whereas no cleavage occurred in the eggs pretreated with N-EMI. This was also the case when eggs pretreated with  $5 \times 10^{-4}$  M N-EMI were washed in sea water and transferred to a solution of  $6.5 \times 10^{-4}$  M glutathione in sea water. Eggs pretreated for 5 minutes with  $10^{-5}$  M N-EMI were transferred 17 minutes after fertilization to a hypertonic medium (1.6 ml. sea water + 0.4 ml. 2.5 N NaCl). All the eggs with a membrane formed around the egg exhibited an "angular plasmolysis." Unfertilized eggs exhibited a smooth or somewhat wrinkled surface on exposure to the hypertonic medium.

#### The effect of N-EMI on eggs of *Paracentrotus lividus*

The above data were supplemented in 1954 with observations on eggs of *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, which were subjected to 9 different concentrations of N-EMI ranging from  $10^{-6}$  to  $10^{-3}$  M. After pretreatment with the reagent for 10 minutes the eggs were transferred to normal sea water. The *Paracentrotus* eggs exhibited a peculiar form of light cytolysis. At two opposite poles of the non-fertilized egg, hyaline blisters were formed, which included a number of smaller blisters or swollen granules, see Fig. 1. The blisters were often of unequal size. In higher concentrations of N-EMI, as for example  $10^{-3}$  M, the granular inclusions were lacking. The blisters resembled here poorly elevated membranes with an underlying indentation. The number of eggs with blisters amounted to about 10 per cent; in the lowest concentration of N-EMI used,  $10^{-6}$  M, the percentage was sometimes 20–30.

Particularly in the highest concentration used,  $10^{-3}$  M, a zone below the egg surface was clear: this indicates probably a stiffening of a cortical zone, see below. Eggs of this kind remained intact for several days. The clear zone was observed although less distinctly also in lower concentrations of the reagent. *Arbacia* eggs treated in the same way as the *Paracentrotus* eggs (transfer to normal sea water after exposure to the reagent for 10 minutes) exhibited no directly visible changes.



The fertilization of *Paracentrotus* eggs subjected for 10 minutes to N-EMI gave on the whole results similar to those described above for *Arbacia lixula*. Protrusions were formed. The fertilization membrane seemed to be thin, and the incorporation of the cortical granules was incomplete. Cortical granules were often present in the perivitelline space. The membrane was more complete in the concentrations  $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M N-EMI than in the lower concentrations. Polyspermy was common; the maximum values counted were 28, 19 and 50 per cent after pretreatment with  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  and  $5 \times 10^{-4}$  M N-EMI respectively.

When the eggs showed the clear zone, already mentioned above, the fertilizability of the eggs was very low, probably due to the solidification of the surface, that is involved in the appearance of a clear zone.

A segmentation and further development occurred only in concentrations below  $10^{-4}$  M N-EMI. A number of blastulae, which cytolysed corresponded probably to polyspermic eggs. The remainder of the blastulae were thick-walled and the blastocoel was angular. Sometimes the mesenchyme cells did not immigrate. The blastocoel thus remained empty. In the same test solution blastulae could be present in which the blastocoel was filled with mesenchyme. As a rule the gastrulation gave rise to a rudimentary endoderm. No normal plutei developed. Arms, if formed, were very short, the skeleton was reduced. Usually the larvae were not of the pluteus type. They resembled the slightly animalized larvae represented by Lindahl ([3], Fig. 3, lower line to the right). It is doubtful, however, if one is concerned with a real animalization or with a general inhibition of the larvae.

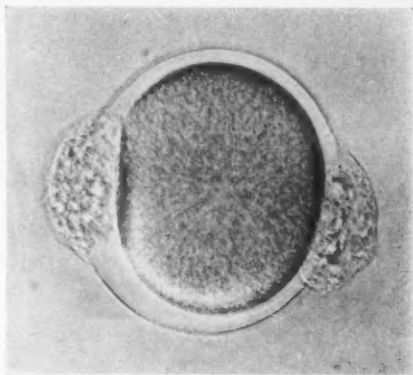


Fig. 1. Non-fertilized egg of *Paracentrotus lividus* pretreated for 10 minutes with  $4 \times 10^{-6}$  M N-Ethylmaleimide. Two opposite regions with light cytolysis. Membrane formation.

#### Membrane elevation of non-fertilized egg as a consequence of treatment with N-EMI

In the higher concentrations of N-EMI ( $10^{-3}$  M) sometimes a membrane formation was observed in non-fertilized eggs of all the species examined. The membrane looked thinner than in fertilized control eggs. Particularly the membrane formation was observed in connection with the centrifugation experiments with *Paracentrotus* and *Arbacia* eggs to be described

below. The membranes were separated from the egg surface by a perivitelline space which in *Paracentrotus* was rich in granular components. In *Psammethinus miliaris* this space was more often free from granular components.

#### The hyaline protrusions-enlarged reception cones

As mentioned above hyaline protrusions sometimes appeared upon fertilization of the egg in presence of N-EMI. *Arbacia* eggs with protrusions are represented in Fig. 2-4. The protrusions represent enlarged reception cones. They resemble closely the exaggerated reception cones, which appear in oocytes or in eggs, which have just passed through their maturation divisions. In oocytes the reception cones withdraw about 15-20 minutes after insemination. In presence of N-EMI, however, the

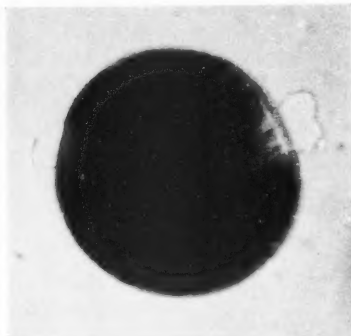


Fig. 2.



Fig. 3.

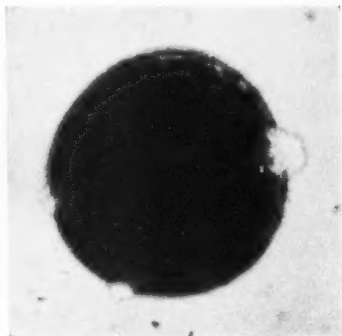


Fig. 4.

Fig. 2-4. Fertilized eggs of *Arbacia lixula* with large "reception cones." The eggs had been pretreated for 15 minutes with  $2 \times 10^{-4}$  M N-Ethylmaleimide.

reception cones of the oocytes remained stable for hours. The same held true for the enlarged reception cones formed in mature N-EMI-pretreated eggs. In some cases the reception cones were seen to withdraw so that the egg surface became smooth. The material of the cones could, however, still be distinguished in the interior of the egg as sectors of hyaline material, see Fig. 3. The appearance of several reception cones on the surface

of the egg revealed that the eggs were polyspermic. Polyspermy in the N-EMI is, however, not always connected with formation of protrusions.

Often the enlarged reception cones appeared as an alternative to the formation of a membrane. Smaller but rather stable reception cones appeared even below an elevated fertilization membrane for example in eggs of *Arbacia* exposed to  $10^{-4}$  M N-EMI in presence of diluted extract from the granular fraction of the egg homogenate (see above p. 155). Also these eggs showed a high incidence of polyspermy.

In one experiment, eggs of *Psammechinus miliaris*, S-form, were subjected for 15 minutes to  $5 \times 10^{-5}$  M N-EMI in sea water. The eggs thereafter were washed in sea water, and finally transferred to a 0.1 per cent solution of serumalbumin in sea water. Polyspermy was prevailing in most of the eggs. Small hyaline protrusions appeared on the egg surface after insemination. These probably represented reception cones of the same nature as those described above. Staining with acetocarmine confirmed the high incidence of polyspermy demonstrated already on the living material. A cleavage occurred in this material but the acetocarmine staining showed that the chromosomes often did not return to the resting stage after the first division. The first cleavage cells separated from each other to a varying extent, and a strong folding of the egg surface occurred. A minor part of the eggs developed into free-swimming gastrulae with a small endoderm region.

#### Centrifugation experiments

The eggs of *Arbacia lixula* were the most suitable for the centrifugation experiment. The eggs were suspended on the border between an isotonic sucrose solution and sea water (see Harvey [1]) and subjected to centrifugation at about  $3300 \times g$ . Control eggs became more elongated than eggs, which had been pretreated for ten minutes with varying concentrations of N-EMI. After 10 minutes centrifugation 50–75 per cent of the control eggs were broken into two fragments. The higher the concentration of N-EMI the less pronounced was the elongation. No fragmentation took place in the N-EMI-pretreated eggs. The return to a more spherical shape was also much slower in these than in the control eggs. It was evident from these results that the rigidity of the cortex was higher in the N-EMI-pretreated eggs as compared with the control eggs. Also the stratification in the interior was more pronounced in the non pretreated than in the pretreated eggs.

The behavior of the eggs in the centrifugation experiments depended rather much on the physiological state of the eggs. In March 1954 eggs of *Arbacia* were centrifuged a) in the presence of sea water, b) in the presence  $10^{-3}$  M N-EMI. Fig. 5 represents an egg from a), Fig. 6 one from b). The centrifugation ( $3300 \times g$ ) lasted for 15 minutes. In a) a considerable elongation of the egg and a stratification of the interior occurred. In b), on the other hand, no elongation and no stratification were observed.

Very well elevated refractile membranes were found in the eggs. The percentage of membrane elevation varied in different runs between 30

and 100. The centrifugation seemed to enhance the membrane elevation because in non centrifuged eggs only few of the eggs exhibited membrane elevation. On the other hand no membranes were visible in the control a). No doubt there is a certain tendency to activation in the eggs subjected to N-EMI, which is reflected in the membrane elevation and the increased rigidity of the cortical and interior cytoplasm.



Fig. 5. Non-fertilized egg of *Arbacia lixula*, centrifuged for 15 minutes at  $3500 \times g$ . Phase contrast.

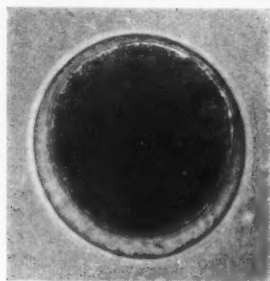


Fig. 6. Non-fertilized egg of *Arbacia lixula* pretreated for 10 minutes with  $10^{-3}$  M N-Ethylmaleimide and thereafter centrifuged for 15 minutes at  $3500 \times g$ . Elevation of refractile membrane. Phase contrast.

Eggs of *Paracentrotus lividus* were likewise subjected to centrifugation. Under the influence of the same acceleration, however, the elongation in the control eggs corresponded only to about 20 per cent. The undoubtedly existing difference in rigidity was therefore not clearly visible. A tendency to stratification of the interior was observed in the control but not in the pretreated egg. A membrane elevation was often observed also in the centrifuged *Paracentrotus* eggs.

#### Precipitation of the jelly coat subsequent to N-EMI-treatment

In eggs of *Arbacia* left for 8–12 hours in  $10^{-3}$  M N-EMI, the jelly coat was precipitated with a strongly marked outline. If the eggs had been pretreated only for 5–10 minutes with  $10^{-3}$  M N-EMI and then transferred to sea water, the effect on the jelly coat was less constant but sometimes rather pronounced. Also for this effect the physiological state of the egg seems to be of relevance.

#### Discussion

The N-Ethylmaleimide (N-EMI) has proved to be a potent inhibitor of the development of the sea urchin egg. It seems to attack the unfertilized, as well as the fertilized egg. This follows from the fact that pretreatment

of the eggs before fertilization has the same effect as continued exposure to N-EMI during fertilization. As in the case of other SH-reagents, N-EMI is obviously less nocuous to the first steps in fertilization than to the ensuing mitotic processes. Thus membrane formation may occur even when the first mitosis is completely arrested. With increasing concentration of N-EMI also the fertilization was blocked. This was probably not due to a direct inhibitory effect of the reagent but to a secondary disturbance with ensuing high rigidity of the cortical layer. This change predisposes for the formation of the protruding hyaline reception cones described above.

Even after pretreatment with N-EMI an angular plasmolysis occurs upon immersion of the fertilized eggs in a hypertonic medium (p. 156). This type of plasmolysis indicates that the typical changes have occurred with respect to the colloidal properties of the cortical layer. The prerequisite is, however, that a continuous membrane has been formed. Eggs with protruding hyaline reception cones but without membrane did not exhibit angular plasmolysis.

Eggs subjected to iodoacetamide and para-chloromercuribenzoate exhibited also subsequent to fertilization the cortical change that is manifested in the angular plasmolysis.

Even if the cortical reactions apparently were normal in eggs pretreated with N-EMI, the incidence of polyspermy was high. It was obvious that the polyspermy prevailed in eggs of *Arbacia* even when — in presence of extract from the granular fraction of egg homogenate — a refractile membrane was elevated (p. 155). N-EMI like p-chloromercuribenzoate evidently interferes with some reaction in the egg surface, which protects against polyspermy. Iodoacetamide, on the other hand, has not this effect.

As was pointed out above, the conditions in N-EMI-pretreated eggs with hyaline protruding reception cones approach those prevailing in oocytes. Only is the number of protrusions lower in the mature N-EMI-pretreated eggs than in the oocytes. In eggs of *Psammodesmus miliaris* undergoing maturation divisions or having just achieved these, a similar smaller number of enlarged reception cones was formed upon insemination.

The pretreatment of the egg with for example  $10^{-3}$  M N-EMI for five minutes (see p. 155) thus seems to bring its cytoplasm into a state resembling that prevailing in the oocyte stage or during the meiotic divisions.

The centrifugation experiments show clearly for *Arbacia* eggs that the rigidity of the cortical layer, as well as that of the interior increase following pretreatment with N-EMI. For *Paracentrotus* eggs the evidence was less striking but both the incomplete centrifugation experiments and the observation of the clear, cortical zone indicated a similar increase in rigidity for the *Paracentrotus* egg.

As known, the rigidity of the cytoplasm of the oocyte is higher than that of the mature egg. Under varied conditions, as in hypertonic medium or in presence of  $10^{-5}$  to  $10^{-4}$  M sodium periodate, the oocyte separates into two parts, see Runnström and Kriszat [7]. One part contains the

nucleus; the cytoplasm of this part is often hyaline or partly hyaline. The other part is granular. Protrusions of most varied kind appear in this latter part. These observations point to the conclusion that the cytoplasm is built up of a fibrous framework of submicroscopic range. The framework would be responsible for the rather high rigidity of the cytoplasm of the oocyte. Upon a coarsening of the framework a tendency to contraction and squeezing out of the interstitial homogenous phase of the cytoplasm prevails. This would result in the separation of the oocyte into two parts of which the optically more homogenous would represent the interstitial component into which the nucleus enters. On this view the formation of the protrusions upon penetration of spermatozoa represents more local processes of the same kind as those bringing about the separation of the whole oocyte into two parts, see also Runnström and Kriszat [8, p. 181, Fig. 4 and 5].

Upon maturation profound changes occur in the cytoplasmic structure of the egg. This is reflected for example in the lowered rigidity of the cytoplasm. An elongation and separation of the mature egg into two parts do not occur as a response to hypertonicity or addition of periodate. The bonding responsible for the framework of the oocytes is broken subsequent to maturation. The framework structure has been replaced by a system of submicroscopic clusters, which are easily displaced in relation to each other, thus giving a low rigidity, see [5, 6].

The treatment of the eggs with N-EMI brings about an increased rigidity of the cortical layer, and also of the interior of the egg. In this way the conditions grow more similar to those prevailing in the oocyte. The attachment of the spermatozoa brings about an increased contraction of the cortical framework by which the squeezing out of the hyaline reception cones is facilitated. Upon retraction of these, the hyaline material does not mix immediately with the surrounding cytoplasm. This is a further indication of the rigid conditions of the cytoplasm components. As described in a previous paper [8], an extremely strong contraction of the cortical layer may occur after the eggs of *Arbacia punctulata* have been fertilized in presence of p-chloromercuribenzoate.

What is the mechanism of the N-EMI-action? The increased rigidity of the cortex and the interior cytoplasm could be directly due to a cross-linkage caused by the N-EMI-molecules. Another possibility is, however, that the action of the agent mainly is an indirect one. It may cause the release of a substance, which causes a gelation of the cytoplasm. At the same time a membrane formation often occurred. This was most conspicuous in eggs subjected to centrifugation. The changes occurring in the non-fertilized egg under the influence of N-EMI involve an activation of the egg, see p. 157. However, the strong inhibitory action of the reagent only allows the initial steps to occur. The view has gradually evolved that the partial break up of granular components or of submicroscopic complexes play a rôle in the activation process [2, 9].

A slow release of jelly precipitating factor [2, 9] was observed as a consequence of treatment of the non-fertilized eggs with N-EMI. This obser-



vation fits in with the view that a breakdown of molecular complexes is involved in the N-EMI-action. Wicklund found that treatment of the eggs with ATP favours the release of the jelly precipitating factor, see [6, p. 285] and [10].

It was shown above that N-EMI arrests the movements of the spermatozoa. The same was found to hold for para-chloromercuribenzoate [8], whereas iodoacetamide or iodosobenzoic acid had no such effect. Bäckström (personal communication) found that the disappearance of reduced glutathion in the spermatozoa followed a similar curve as the exhaustion of the fertilizing capacity of the spermatozoa. The reduced glutathion may play the role of keeping certain enzymes in a reduced state. The SH-reagents para-chloromercuribenzoate and N-EMI may have the capacity of direct reaction with the SH-groups of the critical enzymes.

### Summary

Eggs of *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* (Naples) and *Psammethinus miliaris* (Swedish West Coast) have been submitted to the action of different concentrations ( $10^{-6}$  to  $10^{-3}$  M) of the SH-reagent N-Ethylmaleimide (N-EMI).

N-EMI allows the fixation and penetration of the spermatozoa; certain cortical changes occur, as for example a membrane elevation and the change in the surface layers of the eggs, which results in an angular plasmolysis upon immersion of the eggs in a hypertonic medium. Instead of a membrane formation a varying number of hyaline protrusions may appear. They represent enlarged reception cones. The formation of the protrusions is not always alternative to the membrane formation but less strongly developed protrusions may appear below an elevated membrane.

The fertilization membrane formed in presence of N-EMI is often thinner than normally and the cortical granules may be incompletely incorporated. A pronounced tendency to polyspermy prevails in eggs subjected to N-EMI. The formation of several protrusions on the egg surface is a sign of polyspermy.

The movements of the spermatozoa decay after a brief exposure to N-EMI. Pretreatment of the eggs with the reagent and subsequent insemination of the pretreated eggs in normal sea water gives, however, the same effect as N-EMI-exposure during the fertilization.

The mitotic cycle and egg cleavage is more strongly arrested by N-EMI than the initiating cortical reactions. Only in concentrations below  $10^{-4}$  M a segmentation and further development occurs. The eggs develop into larvae with inhibited differentiation.

A membrane formation may occur in non-fertilized eggs in presence of  $10^{-3}$  M N-EMI. Sometimes also a precipitation of the jelly coat was observed in eggs immersed in N-EMI.

Centrifugation experiments demonstrated that exposure to N-EMI increased the rigidity both of the cortical layer and of the interior of the egg. The formation of a clear cortical zone also indicated a stiffening of the

cortical layer. The centrifugation favored the membrane elevation in non fertilized eggs exposed to N-EMI.

Similarities between the reaction of oocytes and of N-EMI-treated mature eggs are pointed out. The presence of a rather strongly bonded framework in the oocyte is indicated by the high cytoplasmic rigidity, and the behavior of the egg upon insemination, the immersion in hypertonic sea water, or in sea water with  $10^{-5}$  to  $10^{-4}$  M periodate. Upon maturation the framework is replaced by a more clusterlike structure which accounts for many properties of the mature egg [5, 6]. The N-EMI-treatment seems to provoke a more framework-like structure in the mature non fertilized eggs. This accounts for the similarities between the N-EMI-treated mature eggs and the oocytes. The increased rigidity conferred upon the cytoplasm by N-EMI may in part be an indirect effect. The suggestion is made that the primary effect of N-EMI is exerted on granular components or molecular complexes. From these substances are released which act on the remainder of the cytoplasm. In this way changes are induced which involve an activation of the egg. However, the further progress of this activation is blocked by the inducing agent, N-EMI.

#### References

- [1] Harvey, E. B., 1932: Biol. Bull. 62, 155.
- [2] Hultin, E., G. Kriszat, S. Lindvall, G. Lundblad, H. Löw, J. Runnström, E. Vasseur, and E. Wicklund, 1952: Arkiv Kemi 5, 85.
- [3] Lindahl, P. E., 1941: Naturwiss. 29, 45.
- [4] Monroy, A., and J. Runnström, 1952: Exptl. Cell Research 3, 10.
- [5] Runnström, J., 1928: Protoplasma 5, 201.
- [6] — 1949: Advances in Enzymology 9, 241.
- [7] — and G. Kriszat, 1950: Exptl. Cell Research 1, 284.
- [8] — — 1952: Arkiv Zool. 4, 165.
- [9] — E. Wicklund, and H. Löw, 1954: Exptl. Cell Research 6, 459.
- [10] Wicklund, E., 1954: Protoplasma 44, 98.

## Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien

### IV. Die Vitalfärbung der *Achlya racemosa* (Hildebrand) Pringsheim mit den basischen Farbstoffen Neutralrot und Akridinorange

Von

Heinrich Johannes

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für botanische  
Mittelprüfung, Braunschweig

(Eingelangt am 6. April 1954)

	Seite
A. Einleitung . . . . .	166
B. Methodik . . . . .	166
Kultur . . . . .	166
Färbung . . . . .	167
C. Ergebnisse . . . . .	167
I. Die Ergebnisse mit Neutralrot . . . . .	167
a) Hellfeldanalyse . . . . .	167
Das vegetative Mycel . . . . .	167
Die Sporangien und Zoosporen . . . . .	167
Die Geschlechtsorgane . . . . .	171
b) Fluoreszenzanalyse . . . . .	172
Das vegetative Mycel . . . . .	174
Die Sporangien und Zoosporen . . . . .	174
Die Geschlechtsorgane . . . . .	174
II. Die Ergebnisse mit Akridinorange . . . . .	175
a) Hellfeldanalyse . . . . .	175
b) Fluoreszenzanalyse . . . . .	176
1. Kurzfärbungen und Sofortuntersuchung . . . . .	176
Das vegetative Mycel . . . . .	176
Die Sporangien und Zoosporen . . . . .	176
Die Geschlechtsorgane . . . . .	179
2. Langfärbungen . . . . .	180
D. Besprechung der Ergebnisse . . . . .	183
E. Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	188
Literatur . . . . .	190

## A. Einleitung

In früheren Mitteilungen (Johannes 1939, 1941 und 1950) konnte ich zeigen, daß die Vitalfärbung von Pilzmycelien wesentliche Beiträge zur Erforschung der Physiologie der Pilze liefern kann, allerdings nur unter der Voraussetzung einer bestimmten Methodik, die im wesentlichen von Strugger und seiner Schule erarbeitet wurde.

Als Versuchsobjekte dienten bisher Phycomyceten, Hefen und höhere Pilze (Höfler u. Pecksieder 1947). Besonders die Vertreter der Saprolegniaceen bieten aber auf Grund ihrer leichten Kultivierbarkeit alle Voraussetzungen für wirkliche Vitalfärbungen. Es liegen mit ihnen wenige Untersuchungen vor. Erst 34 Jahre nach den Untersuchungen Pfeffers (1886) verwandte Guilliermond (1920—1937) die Saprolegnien zum Studium des Vakuoms, Joyet-Lavergne (1928—1934) studierte das Chondriom und seine Physiologie, Grohrock (1935) nahm Plasmastudien vor und Saksena und Bhargava (1946) berichteten über Vakuolenstudien in den Sporangien von *Thraustotheca clavata*. Den meisten dieser Arbeiten aber haftet der eine Mangel an, daß die Autoren wenig Wert auf eine ausreichende Pufferung der Farblösungen legen, obwohl seit langem bekannt ist, daß die Speicherung eines Vitalfarbstoffes wesentlich von deren Dissoziationsgrad und dem pH-Gefälle Vakuole/Außenmedium abhängt (vgl. Drawert 1948 und 1951 und Johannes 1950).

Als Versuchsobjekt wählte ich *Achlya racemosa* (Hildebr.) Pringsheim, weil diese Art nach den ökologischen Untersuchungen von Lund (1934) Substrate mit sehr unterschiedlichen pH-Werten besiedeln kann. Man kann sie sowohl aus Moortümpeln (bis etwa pH = 4) als auch aus kalkreichen Gewässern (bis etwa pH = 8,5) isolieren. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, diese Art bei verschiedenen pH-Werten zu kultivieren, ohne Schädigungen zu erwarten, die allein schon auf die wechselnde H-Ionenkonzentrationen zurückgeführt werden müßten.

## B. Methodik

### Kultur

Das Untersuchungsmaterial, *Achlya racemosa* (Hildebrand) Pringsheim, wurde in der Umgebung von Hannover und Braunschweig aus Teichen isoliert. Einspormycelien über den Nährboden nach Raper (1937) und Höhnk (1934/35) dienten in sterilem Wasser auf gekochtem Hanfsamen als Ausgangskulturen. Zu den vergleichenden Untersuchungen wurden stets gleichaltrige Mycelien verwendet, die ich dadurch gewann, daß ich in eine kleine Petrischale mit einer etwa 3—5 Tage alten Kultur reichlich kleine Stückchen gekochten Hanfsamens einstreute. Nach 24 Stunden waren diese Köder befallen und wurden einzeln in neue Petrischalen mit sterilem Wasser gesetzt. Sie konnten nun in jedem beliebigen Entwicklungszustand gefärbt und untersucht werden.

### Färbung

Die Färbung ganzer Kulturen habe ich früher eingehend beschrieben (Johannes 1939, S. 76 und 85, und 1941, S. 181). Das Wasser der Kulturen wird abgegossen, die gepufferten Farblösungen werden zugegeben und nach der gewünschten Färbezeit durch farblose Puffer desselben pH-Wertes ersetzt, um eine Umlagerung des Farbstoffes innerhalb der Zellen zu verhindern. Die Herstellung der gepufferten Farblösungen und der farblosen Puffer ist eingehend bei Strugger (1935, 1940, 1949), Drawert (1937) und Johannes (1950, S. 13) erläutert.

Untersucht wurde sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzmikroskop im UV-Licht mit UG-1-Filter oder bei Serienuntersuchungen im Blaulicht mit den Schottfiltern BG 1 und BG 3. Alle Versuche in den verschiedenen pH-Bereichen liefen in zwei parallelen Reihen: ungefärbt und gefärbt. Dadurch war es stets möglich, die reine H-Ionen-Wirkung von der Wirkung der Farbstoffe zu trennen. Doch soll diese Frage in einer besonderen Arbeit behandelt werden.

### C. Ergebnisse

#### I. Die Ergebnisse der Färbungen mit Neutralrot

##### a) Hellfeldanalyse

**Das vegetative Mycel.** Über die grundlegenden Untersuchungen zur Speicherung des Neutralrots durch Saprolegnien konnte bereits früher (Johannes 1939, S. 86) berichtet werden. Die wichtigsten Ergebnisse seien noch einmal kurz zusammengefaßt: Tabelle 1: Im gesamten untersuchten Bereich pH 1,94 bis 11,4 tritt keine Färbung der Hyphenmembranen auf. Im Bereich von pH = 4,24 bis 6,14 kann bei längerer Anfärbung eine im Hellfeld sichtbare Plasma- und Kernfärbung erscheinen, die aber stets disturbant ist, denn die Plasmaströmung hört sofort auf und das Plasma koaguliert bald danach (Tab. 1, eckige | Klammer). Von pH = 6,14 an ist auch bei Langfärbungen von einer Plasmafärbung im Hellfeld nichts mehr zu erkennen, dafür hat die Vakuole den Farbstoff schon recht stark aufgenommen. Aber diese Färbung ist vor allem im stärker alkalischen Bereich nicht inturbant, weil sich das an sich fein verteilte Vakuum unter der Wirkung des Farbstoffes zur Zentralvakuole zusammenschließt (Dubitzki 1934). Die Veränderungen am Tonoplasten durch Neutralrot und die damit verbundene Vakuolenkontraktion ist von Drawert (1938) bei *Allium cepa* eingehend untersucht worden (vgl. auch Küster 1940). Es liegen hier dieselben Verhältnisse vor.

**Die Sporangien und Zoosporen.** Dem vegetativen Wachstum des extramatrikalen Mycels folgt unter normalen Bedingungen die Bildung zahlreicher Sporangien, die reichlich Zoosporen entlassen. Die Sporangien weisen in keinem Entwicklungsstadium und in keinem der untersuchten Bereiche von pH 1,94 bis 11,4 eine Membranfärbung an den Hauptwänden der Sporangien auf (Tab. 2).

Tab. 1. *Vitalfärbung des extramatrigen Mycels mit Neutralrot.*

pH	Hellfeldanalyse				Fluoreszenzanalyse				Plasmaströmung
	Membran	Plasma	Kern	Vakuolen	Membran	Plasma	Kern	Vakuolen	
1,94	—	—	—	—	—	—	—	P	—
2,14	—	—	—	—	—	—	—	P	—
2,96	—	—	—	—	—	—	—	P	(+)
3,68	—	—	—	—	—	—	—	P	++
4,24	—	[+]	[+]	((+))	—	(+) gelbgrün	?	P	+++[-]
5,41	—	[+]	[+]	(+)	—	(+) gelbgrün	?	—	+++[-]
6,0	—	[+]	[+]	+	—	(+) gelbgrün	?	—	+++[-]
6,14	—	[+]	[+]	++	—	+ graugrün	?	—	+++[-]
6,51	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+++
6,7	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+++
6,87	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+++
7,02	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+++
7,4	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+++
8,5	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	++
9,2	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	+
11,4	—	—	—	+++	—	+ graugrün	?	—	—

## Erklärung der Färbungen:

((+)) = sehr schwach, kaum sichtbar, (+) = sehr schwach, deutlich sichtbar,  
 + = schwach, ++ = stark, +++ = sehr stark.

[+] = Färbung stark schädigend.

P = Primärfluoreszenz sehr stark, P = Primärfluoreszenz sichtbar.



Tab. 2. *Vitalfärbung der Sporangien und Zoosporen mit Neutralrot.*

pH	Hellfeldanalyse					Fluoreszenzanalyse					
	Sporangien			Zoosporen		Sporangien			Zoosporen		
	Mem- bran	Plas- ma	Vaku- olen	Plas- ma	Vaku- olen	Mem- bran	Plas- ma	Vaku- olen	Plas- ma	Vaku- olen	Beweg- lichkeit
1,94	—	—	—	—	—	—	—	+ P	—	?P	—
2,14	—	—	—	—	—	—	—	+ P	—	?P	—
2,96	—	—	—	—	—	—	—	+ P	—	?P	—
3,68	—	—	—	—	—	—	—	+ P	—	?P	+
4,24	—	[+]	((+))	[?]	((+))	—	(+) gelb- grün	(+) P	(+) gelb- grün	—	++
5,41	—	[+]	+	[?]	(+)	—	(+) gelb- grün	—	(+) gelb- grün	—	++
6,0	— (+T)	[+]	+	[?]	Tr	(+T) (gold- gelb)	(+) gelb- grün	—	(+) gelb- grün	—	+++
6,14	— (+T)	[+]	++	[?]	Tr	(+T) (gold- gelb)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	+++
6,51	— (+T)	—	+++	—	Tr	(+T) (gold- gelb)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	+++
6,7	— (+T)	—	+++	—	Tr	(+T) (gold- gelb)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	+++
6,87	— (+T)	—	+++	—	Tr	(+T) (gold- gelb)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	+++
7,02	— (+T)	—	+++	—	Tr	(+T) (gold- gelb)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	++
7,4	— (? T)	—	+++	—	Tr	(? T)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	+
8,5	— (? T)	—	+++	—	Tr	(? T)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	(+)
9,2	— (? T)	—	+++	—	Tr	(? T)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	(+)
11,4	— (? T)	—	+++	—	Tr	(? T)	+ grau- grün	—	+ grau- grün	—	(+)

Erklärung der Färbungen (siehe Tab. 1):

(T) = Färbung der Trennwand zum Sporangium oder Tüpfelmembran der Oogonien.

Tr = Tröpfchenfärbung in den Vakuolen sehr stark.

Tr = Tröpfchenfärbung sichtbar.

Die Trennwand Hyphe/Sporangium dagegen färbt sich verschiedentlich mit orangerotem Farbton. Der Farbton entspricht dem der Gametenwände von *Phycomyces* und *Basidiobolus* und der Tüpfelmembran der Saprolegniaceen (Johannes 1939; 88). Es handelt sich hierbei um eine chemische Bindung des Neutralrots, denn Kationen-Adsorption hätte sich durch steigende Zugaben von  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen verdrängen lassen. Nicht in allen pH-Bereichen habe ich sie erkennen können. Vielleicht ist die chemische Bindung auf die Anwesenheit von Farbkationen angewiesen, denn im alkalischen Bereich schien sie zu fehlen.

Die gelegentlich auftretende Plasmafärbung um  $\text{pH} = 4,0$  herum ist stets disturbant wie bei den Hyphen. Eine Speicherung des Farbstoffes in der Vakuole wurde schon um  $\text{pH} = 4,0$  erkennbar, wenn das Sporangium soweit entwickelt ist, daß sich die Zentralvakuole ausgebildet hat. Sie erleidet dann aber unter der Wirkung des Neutralrots ähnliche Veränderungen wie die Hyphen. Im alkalischen Bereich tritt der Tonoplast dann deutlich hervor und glättet sich, d. h. die starke Zerklüftung das Plasmawandbelages wird durch die Vakuolenkonzentration ausgeglichen. In jungen Stadien, solange noch keine Zentralvakuole ausgebildet, sondern das Vakuum noch fein verteilt ist, erkennt man nur oberhalb von  $\text{pH} = 6,5$  vereinzelte Farbtröpfchen im Vakuum, als ob sie im Plasma liegen. Sie sind als Entmischungen zu werten. Im alkalischen Bereich wird diese Entmischung der zusammenhängenden Vakuole zur Regel. Nach anfangs diffuser rot bis rotbrauner (oranger) Farbspeicherung entmischt sich der Farbstoff und sammelt sich in kleineren und größeren Farbtröpfchen. Sie befinden sich in starker Brownscher Molekularbewegung (BMB). Bei sehr starken Färbungen und langer Dauer kann der Farbstoff zu großen Tropfen zusammenfließen und sich in seitlichen Ausstülpungen der Vakuolen am Tonoplasten ansammeln, und dann hat man den Eindruck, als wanderten die Farbtropfen durch ihn hindurch ins Plasma. Das bedeutet aber eine Zerstörung des Tonoplasten, der unmittelbar eine irreversible Schädigung des Cytoplasmas folgt.

Verfolgt man die Weiterentwicklung mit Neutralrot schwach gefärbter Sporangien bis zur Bildung der Zoosporeninitialen, so kann die diffuse Speicherung in der Vakuole so lange bestehen bleiben, bis sich das Protoplasma deutlich in einzelne Portionen, die späteren Zoosporen, zerteilt hat. Ganz plötzlich verschwindet dann die Färbung und tritt fast ebenso schnell als Tröpfchenspeicherung in den Zoosporeninitialen wieder auf (vgl. Saksena und Bhargava 1946). Bei der Zoosporenbildung wird also der gesamte Zellsaft mit zur Bildung der Zoosporen herangezogen. Er verteilt sich auf die einzelnen Zoosporen. Es bleibt also keine Flüssigkeit zurück, die auch nur eine annähernde Struktur wie der Zellsaft besitzt. Der Rest besteht wahrscheinlich nur aus Wasser, dem weitgehend alle Kolloide entzogen wurden. Daß eine Flüssigkeit zurückbleibt, geht daraus hervor, daß die Zoosporen dann bald eine anfangs leichte, sich bald steigende Eigenbewegung aufnehmen. Das Sporangium platzt am Ende und entläßt die Zoosporen. Bei der Entleerung auch sehr stark gefärbter Sporangien — die Färbung muß aber unmittelbar vor der Entleerung erfolgen — in farb-

losen Puffern konnte nie beobachtet werden, daß zugleich eine gefärbte Flüssigkeit mit austrat.

Die Zoosporen nehmen, wie oben erwähnt, schon als Initialen kurz vor ihrer Reife den Farbstoff der ehemaligen Sporangienvakuole auf und speichern ihn in ihren Vakuolen. Erkennbar sind im Hellfeld allerdings nur wenige kleine Farbtröpfchen, so daß der Aufnahme des Neutralrots aus den Sporangienvakuolen eine Entmischung im Vakuum der Zoosporen parallel läuft. Der mehr rote Farbton der Farbtröpfchen in den Zoosporen entspricht den Entmischungstropfen der Zentralvakuolen im alkalischen Bereich. Er gleicht auch den Tröpfchen bei der Speicherung des Neutralrots im Mycel von *Phycomyces* (Johannes 1939). Eine Plasma- oder Kernfärbung habe ich im Hellfeld nie beobachtet. Zoosporen mit diesem Entmischungstropfen im Vakuum sind durchaus lebensfähig und zeigen ganz normale Beweglichkeit. Das soll die letzte Spalte in Tab. 2 vor Augen führen. Das Nachlassen der Bewegung unterhalb von etwa  $\text{pH} = 4,5$  darf nicht als Wirkung des Neutralrots angesehen werden, sondern ist auf die hohe Wasserstoffionenkonzentration zurückzuführen, wie die ungefärbten Kontrollen einwandfrei bestätigen.

Die deutlich zunehmend schwerfälligen Bewegungen sowohl bei der Entleerung der Sporangien als auch beim zweiten Schwimmstadium der Zoosporen im alkalischen Bereich oberhalb des Neutralpunktes werden aber als schädigende Wirkungen des gespeicherten Neutralrots zu werten sein, wie in einem späteren Beitrag noch gezeigt werden soll.

Vitalgefärbte Zoosporen, die sich nach dem Ausschlüpfen encystierten und dann ihr zweites Schwärmstadium durchliefen, zeigten immer noch die roten Farbtröpfchen in den Vakuolen, solange sich die Wasserstoffionenkonzentration zwischen  $\text{pH} = 4,5$  und  $6,5$  bewegte. Auch nach ihrem Auskeimen kann man unter günstigen Bedingungen, d. h. wenn die Zoosporen genügend Farbe gespeichert hatten, noch den Farbstoff erkennen. Sobald sich aber im jungen Keimschlauche die ersten ausgedehnten Vakuolen bilden, habe ich mehrmals beobachtet, daß sich diese Vakuolen dann wieder diffus färben können.

**Die Geschlechtsorgane.** Nachdem die Bildung der Sporangien im Abklingen begriffen ist, erscheinen an den sporangientragenden Haupthyphen die traubig angeordneten Oogonanlagen auf kurzen seitlichen Stielen. Sie sind anfangs völlig mit Protoplasma angefüllt und bilden dann eine Zentralvakuole aus. Das Cytoplasma zerklüftet sich, sammelt sich um einige wandständige Kerne und bildet die Oosphären. Inzwischen stülpen sich aus den Oogonstielen die antheridialen Nebenäste heraus. Sie legen sich dem Oogon an und schnüren an ihrem Ende eine vielkernige Zelle, das Antheridium, ab. Durch eine dünne vorgebildete Stelle in der Oogonwand, dem Tüpfel, sendet das Antheridium einen oder mehrere Befruchtungsschläuche zu den Oosphären. Nach vollzogenem Plasma- und Kernübertritt umgibt sich die Oospore mit einer dickeren Membran. Im Laufe der Reife, die mehrere Wochen in Anspruch nehmen kann, wird auch die Struktur der Oosporen sichtbar. Zwei Reihen von Öltröpfchen umgeben dann das

Plasma der reifen Oospore. Nach längerer Zeit (meist 60 Tagen) keimen die Oosporen.

Bis auf die Keimung der Oosporen lassen sich alle angeführten Entwicklungsstadien in den Petrischalen beobachten und färben. Es ergeben sich bei der Hellfeldanalyse mit Neutralrot die Ergebnisse der Tab. 3.

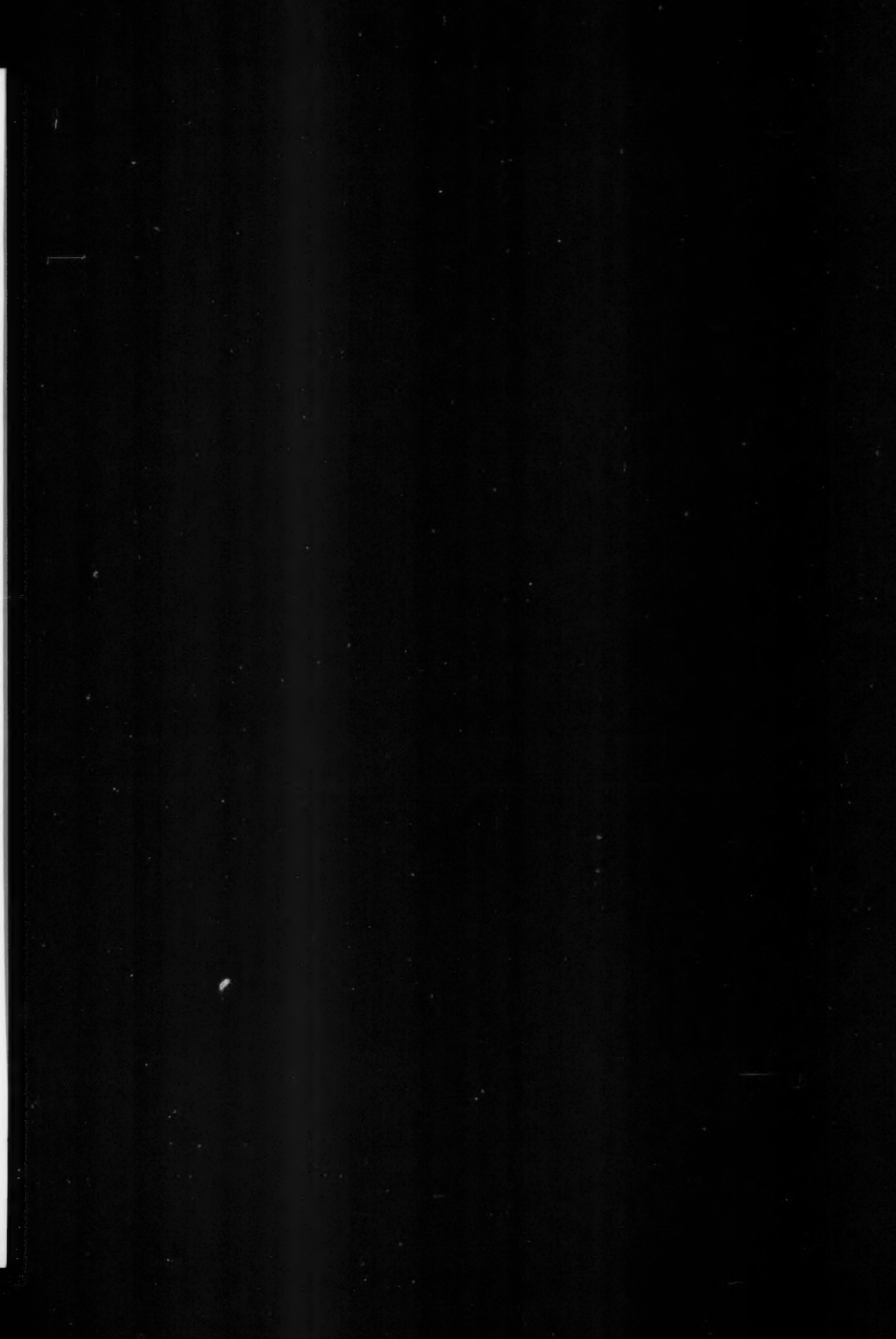
Eine Membranfärbung der gesamten Oogonwand tritt in keinem Fall und in keinem pH-Bereich ein. Aber die Tüpfel, die Eintrittsstellen der Befruchtungsschläuche, als Gameten- (genauer Gametangien-) Wände binden von pH = 6,0 ab bis etwa pH = 7,5 das Neutralrot so stark, daß die Färbung im Hellfeld gut sichtbar ist. Das konnte ich schon bei *Saprolegnia* sp. und anderen Pilzen zeigen (Johannes 1939; 88, Fig. 18). Es handelt sich hierbei um eine elektive Färbung chemischer Bindung und nicht um eine Kationenadsorption, denn die Färbung läßt sich nicht durch Elektrolyte verdrängen. Ob sich außer der Tüpfelmembran auch der dem Tüpfel anliegende Membranteil des Antheridiums mit anfärbt, habe ich nicht entscheiden können. Eine Plasma- oder Kernfärbung trat weder in den Oogonien und Oosporen noch in den Antheridien im Hellfeld sichtbar zutage. Die Vakuolen der Oogonien und das Vakuum des Antheridiums speichern dagegen in demselben pH-Bereich das Neutralrot wie die vegetativen Hyphen oder die Sporangien. Wegen der geringen Ausdehnung des Vakuums im Antheridium ist diese Färbung nur schwach zu erkennen. Noch schwieriger und sehr selten sieht man später in den reifen Oosporen noch rote Farbtröpfchen.

Bei der Bildung der Oosphären in den Oogonanlagen ist ein ähnlicher Vorgang zu beobachten wie bei der Bildung der Zoosporen (s. v.). Die erst diffus gefärbte Zentralvakuole, die als Zwickel zwischen die Oosphärenanlage ragt, verliert zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr schnell die Farbe, die dann, wenn auch sehr schwer sichtbar, in dem Oosphären-Vakuum auftritt. Zurück bleibt wiederum eine nicht mehr färbbare Flüssigkeit.

Auf eine Beobachtung sei noch hingewiesen. Nicht bei diesem Versuchsobjekt (*Achlya racemosa*), wohl aber bei Arten der Gattung *Saprolegnia*, die Myzelgemmen ausbilden, färbt sich die Membran dieser Gemmen mit basischen Farbstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert, d. h. etwa von pH = 3,1 ab bis etwas über den Neutralpunkt hinaus. Die Hyphenmembran dagegen ist auch nicht anfärbbar. Sobald aber die Hyphen anschwellen und sich das Plasma verdichtet, wird die Färbung sichtbar. In Anlehnung an die Arbeiten von Kinzel (1952, 1953) kann man annehmen, daß sich der Pektingehalt der Membranen ändert. Diese Frage bedarf einer Nachprüfung. Ebenso fehlen mir aus dieser Zeit die entsprechenden fluoreszenzoptischen Untersuchungen.

#### b) Fluoreszenzanalyse

Nach den Untersuchungen von Strugger (1940) wird der basische Vitalfarbstoff Neutralrot nicht nur in den Membranen und Vakuolen von Pflanzenzellen gespeichert, sondern auch das Plasma „speichert“ diesen Farbstoff. Allerdings ist diese „Speicherung“ so schwach, daß sie nur im Fluoreszenzlicht nachweisbar ist, im Hellfeld dagegen nur in Erscheinung



Tab. 3. *Vitalfärbung der Geschlechtszellen*  
Erklärung der Färbungen

pH	Helfeldanalyse										Merkmale
	Oogonanlagen			Oosporen				Antheridien			
	Membran	Plasma	Vakuolen	Membran	Plasma	Vakuolen	Öltröpfchen	Membran	Plasma	Vakuolen	
1,94	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,68	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,24	—	—	((+))	—	—	—	—	—	—	((+))	—
5,41	(? T)	—	+	—	—	(+)	—	—	—	(+)	(+) (ge- ge-)
6,0	(+ T)	—	+	—	—	(+)	—	—	—	(+)	(+) (ge- ge-)
6,14	(+ T)	—	++	—	—	+	—	—	—	+	(+) (ge- ge-)
6,51	(+ T)	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(+) (ge- ge-)
6,7	(+ T)	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(+) (ge- ge-)
6,87	(+ T)	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(+) (ge- ge-)
7,02	(+ T)	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(+) (ge- ge-)
7,4	((+ T))	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(+) (ge- ge-)
8,5	—	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(?)
9,2	—	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(?)
11,4	—	—	+++	—	—	++	—	—	—	++	(?)



ungen wie bei Tab. 1 und 2.

173

tritt, wenn sie so stark ist, daß die vorn beschriebenen Schädigungen sichtbar werden. Es gilt nun zu untersuchen, ob auch die im Hellfeld gewonnenen Ergebnisse den Untersuchungen im UV-Licht entsprechen. Dieselben Kulturen sind deshalb auch fluoreszenzoptisch auf ihre Färbung untersucht worden. Die Ergebnisse habe ich zum besseren Vergleich denen der Hellfeldanalyse in denselben Tabellen (Tab. 1—3) gegenübergestellt.

**Das vegetative Mycel** zeigt auch im Fluoreszenzlicht keine Membranfärbung (Tab. 1). Die starke Vakuolenfärbung im Hellfeld ist im UV- oder Blaulicht nicht zu erkennen, im Gegenteil, die Vakuole erscheint als dunkler Schatten im immer leicht erleuchteten Gesichtsfeld. Etwas anders verhält sich aber das Protoplasma. Im Fluoreszenzlicht leuchtet es von pH 6,0 an sehr schwach gelbgrün auf. Kurz über pH = 6,0 (bei pH = 6,14) verstärkt sich das Leuchten sehr wenig und wechselt die Farbe nach Graugrün. Im ganzen bleibt die Färbung sehr schwach und erreicht nie die Intensität anderer Fluorochrome. Diese „Plasmafärbung“ bleibt bis in den alkalischen Bereich erhalten. Die Kleinheit der Kerne in dem sehr schmalen Wandbelag des Protoplasmas läßt keine Entscheidung über ihre Färbung zu. Nach den Erfahrungen an anderen Objekten (Strugger 1940; 117 an *Allium cepa*) kann aber angenommen werden, daß auch die Kerne Neutralrot aufgenommen haben.

Durch Hellfelddbeobachtung und Kontrolle der Plasmaströmung während der Färbungen konnte einwandfrei festgestellt werden, daß alle Kurzfärbungen mit Neutralrot über pH = 4,5 völlig inturbant verlaufen. Absteigend davon läßt die Plasmaströmung merklich nach, um unter pH = 3 vollkommen aufzuhören. Allerdings ist diese Wirkung weniger der Färbung als der hohen Wasserstoffionenkonzentration zuzuschreiben. Das ließen die ungefärbten Kontrollen erkennen.

**Die Sporangien und Zoosporen** folgen im wesentlichen diesem Färbungstypus (Tab. 2). Membranfärbung tritt nicht auf. Nur die Trennwand des Sporangiums zur Trägerhyphle leuchtet ab pH = 6 goldgelb auf. Über pH = 7 ist die Färbung kaum noch zu erkennen. Auch die im Hellfeld sichtbare Vakuolenfärbung bleibt im Fluoreszenzlicht unsichtbar. Nur die blaue Primärfluoreszenz (P) des Eiweißes tritt im ganz sauren Bereich hervor, solange die Vakuolen noch keinen Farbstoff gespeichert haben. Dagegen scheint das Plasma der sich entwickelnden Sporangien und Zoosporen in geringem Maße das Neutralrot aufzunehmen, es leuchtet auch schwach graugrün. Wegen ihrer Kleinheit sind auch hier die Kerne nicht sichtbar.

Weil die gefärbten Vakuolen im Fluoreszenzlicht nur als Schatten sichtbar sind, kann man auch nicht die vorn beschriebenen Farbumlagerungen bei der Bildung von Zoosporen beobachten. Die Angaben über die Beweglichkeit der Zoosporen in der letzten Spalte der Tab. 2 gelten sowohl für die Hellfeldanalyse als auch für die Beobachtungen im Fluoreszenzlicht.

**Die Geschlechtsorgane** schließen sich auch den schon beschriebenen Färbungsbildern an (Tab. 3). Mit steigendem pH-Wert ab pH = 4,24 beginnt ein sehr schwaches Aufleuchten des Plasmas in den Oogonanlagen,

den Oosporen und den Antheridien. Über eine Kernfärbung in diesen Organen kann aber auch hier nichts ausgesagt werden. Die gefärbten Vakuolen sind hier ebenfalls nicht zu erkennen, denn einmal ist der Plasmawandbelag in den Oogonanlagen zu dick, so daß nur in einigen Fällen der Schatten der Zentralvakuole sichtbar wurde, und das andere Mal ist das Vakuum der Oosporen und Antheridien zu klein, um erkennbare Schatten zu werfen. Deshalb ist auch die blaue Primärfluoreszenz unterhalb  $\text{pH} = 4,24$  im ersten Fall schlechter zu sehen und im zweiten Fall nicht eindeutig erkennbar. Dagegen leuchten die Öltröpfchen der reifen Oosporen im stark sauren Bereich in starker blauer Primärfluoreszenz. Oberhalb  $\text{pH} = 4,24$  müßte man auf Grund bisheriger Erfahrungen eine Speicherung des Neutralrots in den Öltröpfchen annehmen. Im Hellfeld war aber nichts zu erkennen, und im Fluoreszenzlicht kann die Frage nicht eindeutig entschieden werden.

Während die Membranen der Oogonanlagen und der Antheridien auch im Fluoreszenzlicht keine Farbstoffspeicherung zeigen, heben sich die wenigen Tüpfelmembranen auf den Oogonanlagen durch eine starke goldgelbe Fluoreszenz hervor. Der fluoreszenzanalytische Nachweis der Tüpfelmembranen und damit überhaupt der Tüpfel wird eine wichtige Untersuchungsmethode bilden, da bei vielen Arten der Saprolegniaceen bisher keine Tüpfel gefunden wurden oder nur schwer erkennbar sind. Eine Untersuchung im behelfsmäßigen Blaulichtmikroskop mit einer Neutralrotlösung in Leitungswasser wird genügen, um die Frage bei kritischen Arten zu klären. In einigen Fällen wird daher eine Revision der systematischen Gliederung notwendig, wie ich in einer späteren monographischen Bearbeitung der Saprolegniaceen zeigen werde.

Soweit Befruchtungsschläuche ausgebildet waren, lassen sie sich durch ihre — wenn auch sehr schwache — „Plasmafärbung“ deutlich erkennen. Ein Übertritt der Kerne konnte aber bisher in vitro mit Neutralrot nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Färbungen mit Neutralrot sich den bisher bekannten Färbungsmechanismen auch bei *Achlya racemosa* unterordnen lassen. Im Gegensatz zu *Phycomyces* tritt aber keine Membranfärbung beim Mycel, den Sporangien und Zoosporen, den Oogonanlagen, Oosporen und Antheridien auf. Lediglich die Oosporenmembranen zeigen eine noch ungeklärte Farbspeicherung zwischen  $\text{pH} = 6,0$  und  $\text{pH} = 7,0$ . Die Färbung der Tüpfelmembranen (als Gametangienmembranen) entspricht auch den Erfahrungen an *Phycomyces* und *Basidiobolus*. Der sehr schnelle und eindeutige Nachweis von Tüpfeln im Blaulicht hat für die Systematik entscheidende Bedeutung.

## II. Die Ergebnisse der Färbungen mit Akridinorange

### a) Hellfeldanalyse

Da die Speicherung des Akridinorange im Hellfeld nur sichtbar ist, wenn das Akridinorange so stark aufgenommen wird, daß Schädigungen

auftreten, wird von ihrer Darstellung hier abgesehen. Als ausgesprochenes Fluorochrom ist nur die Analyse im Fluoreszenzmikroskop von Bedeutung

### b) Fluoreszenzanalyse

#### 1. Kurzfärbungen und Sofortuntersuchung

Mit dem Ausdruck „Sofortuntersuchung“ bezeichne ich alle Färbungsbilder, die unmittelbar im Anschluß an „Kurzfärbungen“ gewonnen wurden, im Gegensatz zu den Bildern nach „Langfärbungen“. „Kurzfärbungen“ können bis zu 30 Min. dauern, alles darüber gehört zu den „Langfärbungen“ (vgl. Johannes 1950; 22 ff.). Untersucht wurden Akridinorange-Lösungen 1 : 10.000 mit pH-Werten von pH = 2,31 bis pH = 10,8. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 übersichtlich dargestellt.

**Das vegetative Mycel.** Entsprechend allen bisherigen Erfahrungen mit basischen Farbstoffen tritt niemals eine Membranfärbung auf. Im Inneren dagegen wird das Akridinorange schon bei pH = 2,31 sichtbar, allerdings ist es nur mit sehr guter Optik als graugrüne Fluoreszenz nachweisbar. Aber schon um pH = 4,0 verstärkt sich die Färbung, um ab pH = 6,0 deutlich grün zu erscheinen. Dieser Bereich entspricht etwa dem Entladungspunkt (EP) der färbbaren Plasmakolloide (soweit man bei diesen von einem Punkt sprechen kann), denn dieser Bereich wurde bereits früher mit anderen Farben (Berberinsulfat und Kaliumfluoreszein) gefunden (Johannes 1939; 87, Tab. 8). Das grüne Protoplasma läßt im sauren Bereich gut feinste Struktur erkennen. Diese Struktur verändert sich aber von pH = 6,0 ab, sobald auch die Vakuole die Farbe speichert und mit leichter Vakuolenkontraktion antwortet. Besonders deutlich heben sich im sauren Bereich zwischen pH = 3,18 und pH = 5,79 Kerne aus dem Cytoplasma ab, weil sie sich in diesem Bereich intensiver anfärben als das sie umgebende Plasma. Sie sind noch einmal deutlich zwischen pH = 6,27 und pH = 6,8, denn hier nehmen sie so stark das Akridinorange auf, daß sie fast rein gelb werden. Aus früheren Untersuchungen an Kernen von *Phycomyces* ist anzunehmen, daß diese Farbspeicherung bis gelb nicht ohne Schädigungen ist, obwohl es scheint, daß die Hyphen normal weiterwachsen. Neben Plasma- und Kernfärbung erkennt man aber schon von etwa pH = 5,0 ab eine anfangs leichte diffuse rötliche Vakuolenfärbung. Sie ist aber nur dort zu sehen, wo die Vakuole sehr dick ist, also eine verhältnismäßig dicke Farbschicht vorliegt. Die Vakuolenfärbung verstärkt sich zum alkalischen Bereich hin und ist über pH = 6,0 etwa gleich intensiv kupferrot. Mit dieser starken Speicherung geht aber eine sich verstärkende Vakuolenkontraktion einher. Ehe die Vakuole aber Farbe speichert, leuchtet sie blau in der Primärfluoreszenz ihrer Eiweiße (P). Über pH = 8,8 nimmt die Plasmaströmung schnell ab und hört um pH = 10,0 ganz auf. Auch hier bedeutet die Sistierung der Plasmaströmung eine starke Schädigung durch den Farbstoff. Im sauren Bereich dagegen hört die Plasmaströmung auf, weil nicht die Farbe, sondern die hohe cH zu Schäden Anlaß gibt.

**Die Sporangien und Zoosporen.** Die Sporangien verhalten sich wie das vegetative Mycel. Eine Membranfärbung tritt nur an der Trennwand zur





Tab. 4. Vitalfärbung der A.

(J = Imb)

Erklärung der

Tropoplasma, Bd. XLIV 2

13

pH	Hyphen				Sporangien			Zoosporien	
	Membran	Plasma	Vakuolen	Plasma Ström.	Membran	Plasma	Vakuolen	Membran	Plasma
2,31	—	+ grau	?	—	—	+ grau	?	—	+ grau
3,18	—	J grau-grün	P blau	(+)	—	J grau-grün	P blau	—	+ grau
4,20	—	J grau-grün	P blau	++	—	J grau-grün	P blau	—	+ grau
4,9	—	+ grau-grün	?	++	—	+ grau-grün	?	—	+ grau
5,79	—	+ grau-grün	+ orange	+++	—	+ grau-grün	+ orange	—	+ grau
6,03	—	++ grün	++ rot-braun	+++	((+T) gelblich)	++ grün	++ rot-braun	—	+ grau
6,27	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+++	(+T) (gelb)	++ grün	+++ kupfer-rot	—	+ grau
6,65	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+++	(+T) (gelb)	++ grün	+++ kupfer-rot	—	+ grau
6,8	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+++	(+T) (gelb)	++ grün	+++ kupfer-rot	—	+ grau
7,22	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+++	(+T) (gelb)	++ grün	+++ kupfer-rot	—	+ grau
7,9	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+++	?	++ gelb-grün	+++ kupfer-rot	—	+ grau
8,8	—	++ grün	+++ kupfer-rot	+	?	++ gelb	+++ kupfer-rot	—	+ grau
10,8	—	++ gelb	+++ kupfer-rot	—	?	+++ gelb-orange	+++ kupfer-rot	—	+ grau



er *Achlya racemosa* mit Akridinorange.  
(Imbibitionsfärbung.)  
der Färbungen wie vorher.

Zoosporen		Geschlechtsorgane								
		Oogonanlagen			Oosporen			Antheridien		
Plasma	Vakuolen	Membran	Plasma	Vakuolen	Membran	Plasma	Öltröpfchen	Membran	Plasma	Vakuolen
+ grau-orange	—	—	J grau-grün	?	—	alle Farbtöne	?	—	+ grau	?
+ grau-orange	—	—	J grau-grün	?	—	J grau-grün	?	—	+ grau	?
+ orange-kupfer-rot	—	—	J grau-grün	?	—	J grau-grün	?	—	+ grau-grün	—
+ grün	—	—	(+) grün	?	—	+ grau-grün	?	—	+ grau-grün	—
++ grün	+ orange	—	++ grün	+ orange	—	+ grün	?	—	+ grün	Tr rot
++ grün	+ orange	(+T) (gelb)	+++ grün	+ rot-braun	—	++ grün	?	—	+ grün	Tr rot
++ grün	+ orange	(+T) (gelb)	+++ grün	++ kupfer-rot	—	++ grün	?	—	+ grün	Tr rot
++ grün	+ orange	(+T) (gelb)	+++ grün	++ kupfer-rot	—	++ grün	?	—	+ grün	Tr rot
++ grün	+ orange	(+T) (gelb)	+++ grün	++ kupfer-rot	—	++ grün	?	—	+ grün	Tr rot
++ gelb	Tr rot	(+T) (gelb)	+++ grün	++ kupfer-rot	—	von grün über gelb über orange über rot nach kupfer-rot	?	—	+ gelb-grün	Tr rot
++ orange	Tr rot	(+T) (gelb)	+++ gelb-grün	++ kupfer-rot	—		?	—	++ gelb	Tr rot
+++ rot	Tr rot	?	+++ gelb	++ kupfer-rot	—		?	—	++ orange	++ orange
+++ kupfer-rot	Tr rot	?	+++ orange	++ kupfer-rot	—		?	—	+++ kupfer-rot	+++ kupfer-rot

Trägerhyph auf, wie das bei der Färbung mit Neutralrot vorn beschrieben wurde. Wegen der starken Plasmaansammlung sind aber die Kerne nicht oder sehr selten zu erkennen, ebenso verschwinden sie wieder im alkalischen Bereich, weil Kerne und Cytoplasma in derselben Intensität aufleuchten. Einwandfreie Kernteilungen konnte ich nicht nachweisen, obwohl oft Bilder vorhanden waren, die darauf hindeuteten. Zwar soll man die Chromosomen mit Akridinorange vital färben können, ohne den Kernteilungsvorgang wesentlich zu stören (Strugger 1940), bei der Kleinheit der Chromosomen und ihrer geringen Zahl wird aber nie eine Entscheidung mit Sicherheit gefällt werden können. Das Protoplasma der Sporangien scheint aber gegenüber dem Akridinorange viel empfindlicher zu sein, besonders vor der Reife. Schon kurz unter  $\text{pH} = 8,0$  färben sich Plasma und Kern gelbgrün, gelb und endlich gelborange. Die Kerne zeigen diese Farbstufen vielfach um eine  $\text{pH}$ -Stufe eher als das Cytoplasma. Zumindest ist also der  $\text{pH}$ -Bereich über  $\text{pH} = 7,5$  für die sich entwickelnden Sporangien gefährlich. Er wurde in Tab. 4 durch dickere Umrandung kenntlich gemacht.

Die Vakuolen der Sporangien sind eigentlich nur so lange deutlich zu sehen, solange sie als Zentralvakuolen bestehen, sie leuchten dann in blauer Primärfluoreszenz im sauren Bereich und orange bis kupferrot im alkalischen Bereich. Je weiter die Zoosporen heranreifen, desto schwerer ist die Vakuole zu erkennen. Sie wird klein, leuchtet folglich weniger, und das Plasma der größer werdenden Zoosporen tritt intensiver hervor und verdrängt endlich den Rest an Vakuolen. Die bei der Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht als Schatten sichtbaren Vakuolen waren dort besser zu sehen, weil sie den Kontrast zu den Zoosporeninitialen besser betonten. Aber wie dort ist auch hier zu beobachten, daß plötzlich jeder Farbstoff aus den Vakuolen verschwindet und als Tröpfchen im Vakuum der Zoosporen wieder erscheint.

Die Zoosporen verhalten sich im Grunde genau wie die vegetativen Hyphen: Plasma- und Kernfärbung in denselben  $\text{pH}$ -Bereichen, ebenso die Vakuolenfärbung, die allerdings über etwa  $\text{pH} = 7,0$  nur selten diffus ist, sondern die „Tröpfchenspeicherung“ zeigt. Es tritt hier sehr schnell eine Entmischung ein. Als nicht umhütete Plasmakugeln sind die Zoosporen bis zur Zeit der Reife sehr empfindlich gegen die Vitalfarben. Im sauren Bereich bis etwa  $\text{pH} = 4,2$  sterben sie ab und das Plasma färbt sich einheitlich kupferrot. Ebenso zeigt das Plasma bereits um  $\text{pH} = 7,9$  Schädigungen.

Die Schädigungen scheinen aber schon früher aufzutreten, denn bereits um  $\text{pH} = 7,5$  herum heben sich die Kerne — je Zoospore ein zentral liegender Kern — deutlich gelb bis orange heraus. Diese schädigenden  $\text{pH}$ -Bereiche sind in der Tab. 4 durch stärkere Umrandungen hervorgehoben worden. Innerhalb dieser Bereiche erfolgt auch keine Entleerung der reifen Zoosporen, auch schwärmen und keimen sie nicht aus, wenn sie schon entleert sind. Bekanntlich ist bei *Achlya racemosa* das erste Schwärmstadium weitgehend reduziert, es besteht nur noch aus dem Auspressen der Zoosporen aus dem Sporangium, vor dem sie sich in einem Haufen ansammeln. Während dieser Ruheperiode, die je nach den Außenbedingungen 5–30 Min. dauert, encystieren sich die Zoosporen, um dann wieder auszuschwärmen.

Das zweite Schwärmstadium unterscheidet sich im Färbungsmodus in keiner Weise von den reifen Sporen im Sporangium oder den Zoosporen beim Schlüpfen. Die Sporenhäute färben sich nicht, weder in der Zeit, wo sie noch den Plasmaleib enthalten, noch später, wenn sie als leere Hülle an der Sporangienmündung liegenbleiben.

Freischwimmende Zoosporen, die innerhalb des Bereiches von etwa  $\text{pH} = 5,0$  bis  $\text{pH} = 7,0$  gefärbt wurden, legten dasselbe Verhalten wie encystierte Zoosporen an den Tag. Noch Stunden nach dem Auskeimen ist Plasma-, Kern- und Vakuolenfärbung nachweisbar. Wie ich aber früher schon zeigen konnte (Johannes 1950; 18), sind mit Akridinorange vitalgefärbte Zellen sehr empfindlich gegen Bestrahlung, besonders mit kurzwelligem Licht. Im Dunkeln wachsen sie normal weiter, sie erleiden aber im Licht ähnliche Nekrosen wie das Keimmycel von *Phycomyces*.

**Die Geschlechtsorgane.** Bei der Betrachtung der Färbungen der Sexualorgane seien folgende Gruppen unterschieden: Oogonanlagen, die Oosporen und die Antheridien.

Die Oogonanlagen folgen den bisher beschriebenen Färbungstypen: keine Membranfärbung, sichtbare „Plasmafärbung“ zu erkennen. Im sauren Bereich schwach graugrün, später grün und im stark alkalischen Bereich gelb bis orange. Kerne sind nicht zu sehen. Ob die Öltröpfchen der Oosporen Farbe gespeichert haben, ist anzunehmen, aber nicht zu entscheiden. Ausgesprochen deutliche Membranfärbung trat sonst nie ein.

Die Oosporen eines Oogons leuchten in den einzelnen Bereichen nicht immer gleichmäßig und gleichfarbig auf. Stets befinden sich unter den zwei bis fünf Oosporen eine oder mehrere, die homogen kupferrot oder orange bis gelblich gefärbt sind. Nach allen bisherigen Erfahrungen an Pilzen mit Akridinorange kann man schließen, daß also nicht alle Oosporen noch dieselbe „Keimfähigkeit“ haben werden. Beweise dafür fehlen allerdings noch. Feststeht aber, daß kupferrot gefärbte Oosporen schon an der Struktur erkennen lassen, daß sie tot sind. Auch orange gefärbte Oosporen haben eine etwas andere Plasmastruktur als ungefärbte Oosporen. Nach Erfahrungen an keimenden Sporen von *Phycomyces* (Johannes 1950; 23) müßten auch noch die gelb gefärbten Oosporen zu den „geschädigten“ oder „primär nicht keimungsfähigen“ Organen zu rechnen sein. Gelegentliche Beobachtungen an den keimenden Oosporen gefärbter Kulturen ließen nie mit Sicherheit erkennen, daß noch Farbstoff enthalten war. In der langen Zeit von 60–70 Tagen wurde sicher die Farbe weitgehend abgegeben; zumindest zeigen aber die Färbungen, daß die Oosporen eines Oogons einander physiologisch nicht gleichwertig sind.

Die Antheridien folgen ganz dem Färbungstypus der Zoosporen. Sie sind ebenfalls sehr empfindlich und zeigen ganz deutlich im stark sauren und stark alkalischen Bereich Nekrosen. Auch diese Bereiche wurden in Tab. 4 durch stärkere Umrandung hervorgehoben. Befruchtungsschläuche habe ich oft beobachtet, zwischen  $\text{pH} = 5,0$  und  $7,0$  war ihr Plasma grünlich, soweit sie sich noch nicht entleert hatten. Auch ihre Membran färbte sich nicht. Kerne konnte ich nicht mit Sicherheit feststellen.

In früheren Untersuchungen (Johannes 1939; 100, und 1941; 183) ergab sich eine unterschiedliche Färbung der Oogonien und Antheridien. Einmal (1939) handelte es sich um saure und basische Farbstoffe und das andere Mal (1941) um einen Farbstoff, der nur auf Grund seiner Lipidlöslichkeit aufgenommen wurde (Rhodamin B). Um diesen Unterschied der Geschlechter sichtbar zu machen, eignet sich das Akridinorange nicht. Es ist schon in solchen geringen Spuren im Plasma nachweisbar, daß man keinen Unterschied zwischen Oogonien und Antheridien (auch wegen der nicht vergleichbaren „Objektdicke“) machen kann. Da auch noch die Membranfärbung der Saprolegnien wegfällt, können die Geschlechter auch nicht wie bei *Phycomyces* (Johannes 1939) unterschieden werden.

## 2. Langfärbungen

Bei den „Kurzfärbungen“ und „Sofortuntersuchungen“ ließen sich zwar einzelne Färbungstypen herauschälen, die unseren bisherigen Vorstellungen über die Aufnahme basischer Farbstoffe entsprechen, doch waren die Färbungsbilder gerade im Plasmawandbelag so wechselnd — sowohl in bezug auf die Intensität als auch auf die Farbtonung —, daß sie nicht allein mit „physiologischen“ Unterschieden erklärt oder abgetan werden können. Bei der Färbung und Beobachtung ganzer Kulturen besteht daher die Gefahr, daß die beobachteten Hyphen durch Druck oder Knickung mehr oder weniger geschädigt sind und daß man bei einer Nachkontrolle nur in den seltensten Fällen dieselben Hyphen wiederfindet. Auch die Durchmusterung aller Hyphen ist nicht möglich. Prüft man dann das Wachstum nach einigen Tagen, so besteht auch hier keine Gewißheit, daß 1. alle Hyphen bei „Kurzfärbungen“ dieselben Farbstoffmengen erhielten, also auch denselben „Färbungstypus“ aufwiesen, und 2. dieselben beobachteten gefärbten Hyphen wirklich einen neuen Zuwachs zeigten. Gerade aber die Färbungsmöglichkeiten lebenden Protoplasmas sind von solcher Wichtigkeit, daß nur eine andere — einwandfreiere — Methodik diese Fragen klären kann.

Ich ging folgendermaßen vor: Ganze Kulturen wurden in Petrischalen mit mehreren Wiederholungen in gepufferten Lösungen verschiedener pH-Werte aufgezogen. Die Hälfte der Kulturen blieb ungefärbt, während den anderen Akridinorange im Verhältnis 1 : 500.000 zugesetzt wurde. Zu den einzelnen Versuchsreihen verwandte ich sehr junge — meist 24 Stunden alte —, gerade angewachsene Kulturen derselben Ausgangskultur. Es war meist nur ein feiner, etwa 3 mm langer Hyphenkranz um den Köder herum erkennbar. Zur Untersuchung wurde der Köder mit der *Achlya* nicht dem Medium entnommen und auf einen Objektträger gebracht, sondern die Kulturflüssigkeit in den Deckel der Schale soweit abgegossen, daß die Kultur in der Mitte der Schale festlag und mit Wasserimmersionen beobachtet werden konnte. Jede Schädigung des Pilzes durch Druck oder Umsetzen war ausgeschlossen. Die Untersuchung fand täglich statt und wurde bis zu 14 Tage lang ausgedehnt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Da keine Membranfärbung auftrat und die Kernfärbung auch recht



Tab. 5. Färbungsbilder bei  
(J = Imbibitionsfärbung, P = Prin

pH	Färb									
	1 h		1 d		3 d		4 d		5 d	
	Pl	V	Pl	V	Pl	V	Pl	V	Pl	V
2,2	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	<b>P</b>	tot		tot		tot	
3,18	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	<b>P</b>	J	P	J	P
4,9	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	<b>P</b>	J	P	J	P
5,55	((+))	P	?	P	<b>J</b>	<b>P</b>	<b>J</b>	P	J	(P)
6,88	++	+	+	+	+	+	+	((+))	(+)	(Tr)
7,15	++	++	++	++	+	<b>Tr</b>	+	Tr	(+)	(Tr)
8,1	++	+++	++	+++	+	<b>Tr</b>	+	Tr	(+)	(Tr)
8,4	+++	+++	+++	+++	+	<b>Tr</b>	+	Tr	(+)	(Tr)



bei Langfärbungen mit Akridinorange.  
 Primärfluoreszenz, Tr = Tröpfchenfärbung.)

Färbungsbilder nach												
d	6 d		7 d		8 d		9 d		11 d		14 d	
V	Pl	V	Pl	V	Pl	V	Pl	V	Pl	V	Pl	V
tot	tot		tot		tot		tot		tot		tot	
P	J	(P)	J	(P)	J	((P))	J	—	J	—	J	—
P	J	(P)	J	(P)	J	((P))	J	—	J	—	J	—
(P)	J	(P)	J	(P)	J	—	J	—	J	—	J	—
(Tr)	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—
(Tr)	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—
(Tr)	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—
(Tr)	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—	J	—

Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzymyceten

problematisch erschien, wurden sie nicht in die Tabelle aufgenommen. Wichtig erschienen vor allem „Plasmafärbung“ und Vakuolenfärbung.

1. Sofort nach dem Ansetzen der Kulturen, d. h. nach etwa 1 Stunde Färbezeit, wurde das Färbungsbild festgelegt. Es zeigten sich die vorn beschriebenen Färbungsbilder einer „Sofortuntersuchung“ von „Kurzfärbungen“.

Protoplasma: graugrün im sauren Bereich bis etwa  $\text{pH} = 6$ . Anschließend zum alkalischen Bereich hin sich steigernde Grünfluoreszenz, die in einigen Hyphen bis Gelb umschlug.

Im extremen Bereich oft Plasmoptysen mit ausgetretenem „kupferrotem“ Plasma und allen Übergängen über Orange, Gelb, Grün bis zum Graugrün.

Der Gesamteindruck war der einer schwachen Färbung. Unterhalb von  $\text{pH} = 6$  ist die graugrüne Färbung sehr schwer zu erkennen und wird als reine Imbibitionsfärbung (J) gekennzeichnet.

Vakuom: Auch etwa bis  $\text{pH} = 6$  im sauren Bereich blaue Primärfluoreszenz (P). Von da ab sich steigernde diffuse Rotfärbung, die etwa ab  $\text{pH} = 7$  gleißend kupferrot wurde. Mit steigender Alkalinität zunehmende Vakuolenkontraktion.

In jede Petrischale wurden nach der Untersuchung drei nicht infizierte Köder freischwimmend eingelegt, um zu prüfen, wann sie durch Zoosporen befallen werden und wie sich diese jungen Tochterkulturen verhalten.

2. Die Kontrolle nach 1 Tag ergab im wesentlichen dasselbe Bild wie am ersten Tage. Die Färbung des Protoplasmas erschien hin und wieder etwas schwächer.

3. Die Kontrolle nach 3 Tagen hat ein anderes Bild:

Protoplasma: Unter  $\text{pH} = 3$  und über  $\text{pH} = 9$  waren die Hyphen abgestorben, stark kollabiert, das Plasma koaguliert und in allen Farbtönen von Rötlich bis Graugrün gefärbt.

Die Imbibitionsfärbung blieb bis etwa  $\text{pH} = 5$  oder 6 bestehen. Die aber am 1. und 2. Tag beobachtete grüne Fluoreszenz hatte erheblich abgenommen. In dem  $\text{pH}$ -Bereich zwischen  $\text{pH} = 6-7,5$  (8) hatten sich Sporangien gebildet, die wegen der stärkeren Plasmaansammlung auch etwas intensiver gefärbt erschienen.

Vakuom: Außer unter  $\text{pH} = 3$  war bis etwa  $\text{pH} = 5$  oder 6 die blaue Primärfluoreszenz (P) erhalten geblieben. Zum alkalischen Bereich hin aber war die diffuse Rotfluoreszenz verschwunden. Im Vakuom war der Farbstoff in Form kleiner kupferroter Tröpfchen (Tr) verteilt. Diese Vakuolen zeigten keine Primärfluoreszenz.

Tochterkulturen: Nur zwischen  $\text{pH} = 5-7$  vorhanden. Es ist weder eine einwandfreie Plasmafärbung noch eine Farbspeicherung im Vakuom zu erkennen.

4. Die Kontrolle nach 4 Tagen entsprach im wesentlichen dem Ergebnis nach 3 Tagen.

5. Die Kontrolle nach 5 Tagen zeigt:

Protoplasma: Unter  $\text{pH} = 3$  und über  $\text{pH} = 9$  Hyphen tot. Darüber bis

pH = 5–6 typische Imbibitionsfärbung (J). Weiter zum alkalischen Bereich starke Abnahme der „Färbung“. Man möchte sie der Imbibitionsfärbung gleichsetzen. Auch Sporangien und Oogonanlagen erscheinen kaum intensiver gefärbt. Tote und geschädigte Hyphen sind am Habitus und an der stärkeren Färbung erkennbar.

Vakuom: Primärfluoreszenz bis etwa pH = 5–6, doch anscheinend schwächer. Sonst „Tröpfchenspeicherung“, aber auch diese hat deutlich abgenommen, d. h. es sind weniger und kleinere „Tröpfchen“ geworden.

Tochterkulturen: Auch zwischen pH = 6–7 noch Kulturen angegangen. Weder Plasmafärbung noch Vakuolenspeicherung sind zu erkennen.

6. Die Kontrolle nach 6 Tagen zeigt:

Protoplasma: Unter pH = 3 und über pH = 9 Hyphen tot. Im übrigen pH-Bereich nur Imbibitionsfärbung (J).

Vakuom: Schwache Primärfluoreszenz (P) bis pH = 5 oder 6. Diffuse und „Tropfen“-Speicherung vollständig verschwunden, an ihre Stelle tritt aber nicht die Primärfluoreszenz.

Tochterkulturen: Im Bereich von pH = 5–8 angegangen, z. T. (pH = 5–6) beginnende Sporangienbildung. Keinerlei Färbung!

7. Die Kontrolle nach 7 Tagen ergibt das vortägige Bild.

8. Die Kontrolle nach 8 Tagen zeigt:

Protoplasma: Unter pH = 3 und über pH = 9 Hyphen tot. Im übrigen pH-Bereich nur Imbibitionsfärbung (J).

Vakuom: Keinerlei Farbspeicherung mehr erkennbar. Auch die Primärfluoreszenz im sauren Bereich ist fast vollständig verschwunden.

Tochterkulturen: Fast so groß wie alte Kulturen, im Bereich pH = 5–6 gut entwickelt und fruktifizierend. Zwischen pH = 6–7 etwas und zwischen pH = 7–8 stark in der Entwicklung zurück.

9. Die Kontrollen nach 9–14 Tagen änderten das Bild nicht mehr.

Aus den Ergebnissen der vorstehenden Reihenuntersuchungen, die in den Jahren 1944, 1945, 1947, 1948, 1949 und 1952 mit gleichem Erfolg wiederholt wurden, ergeben sich somit sehr wichtige Hinweise auf die Mechanik der Speicherung des Fluorochroms Akridinorange und anderer basischer Farbstoffe, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden sollen.

#### D. Besprechung der Ergebnisse

Schon in einer früheren Arbeit (Johannes 1950) konnte ich an Hand von Versuchen wahrscheinlich machen, daß sich das Protoplasma nicht vital im Sinne einer Speicherung anfärben läßt. Jede Ionenadsorption im Plasma, die sich an den gelbgrünen, gelben, orangeroten oder gar kupferroten Farbtönen bei Akridinorange erkennen läßt, bedeutet eine starke Beschwerung lebenswichtiger Carboxylgruppen, so daß das Plasma nach kürzerer oder längerer Zeit abstirbt. Die Veränderung bis zur Schädigung ist auf alle Fälle schon von schwach gelblichen Farbtönen ab irreversibel. Auch jede Bindung von Farbstoffmolekülen an Plasmalipide bedeutet einen Eingriff in die Lebensfähigkeit. So konnte Hofmeister (1948)

zeigen, daß sich nach Färbung mit Chrysoidin die Permeabilität des Protoplasten für verschiedene Stoffe erheblich ändert. Doch verschwindet diese Wirkung des Chrysoidins vollkommen, wenn der Farbstoff durch Wanderung wieder aus dem Plasmagefüge verschwunden ist. Diese Veränderungen durch die lipophilen Bindungen eines Farbstoffes sind also reversibel.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse gestatten uns noch einen weiteren Einblick in die Mechanik der Farbstoffspeicherung.

1. In den gepufferten Farblösungen von Akridinorange färben sich die Vakuolen der *Achlya* von einem pH-Bereich ab, von dem wir wissen, daß die Dissoziation der Farbe ausklingt und statt dessen mehr Farbmoleküle zur Verfügung stehen. Die anfangs diffuse Rotfärbung der Vakuolen deutet auf eine Anreicherung von Farbionen hin. Um Höfler (1947) zu folgen, hat die *Achlya racemosa* also „leere“ Zellsäfte, d. h. Zellsäfte mit verhältnismäßig wenig zelleigenen Speicherstoffen (Lipoiden?). Mit dem Auftreten und der Zunahme von Farbmolekülen im Außenmedium tritt eine Wanderung dieser Moleküle in die Vakuolen ein, sie permeieren. Dabei benutzen die Moleküle nur „lipoid“ Wege, d. h. man nimmt an, daß Plasmalemma und Tonoplast durch lipoiden Kanäle miteinander verbunden sind, daß also eine kontinuierliche Lipoidbrücke außen/innen besteht. Eine unmittelbare Beeinflussung des Plasmas findet dabei anfangs nicht statt, wenigstens nicht, solange das Gefälle außen/innen aufrechterhalten bleibt. Erst nach Absättigung der Vakuolen treten dann Farbmoleküle aus den Lipoidbrücken ins Plasma über und rufen die oben genannten Veränderungen oder Schädigungen hervor. Die Permeation der Farbmoleküle kann man sich bis zur Konzentrationsgleichheit Außenmedium/Vakuole vorstellen. In der Vakuole herrscht nun aber eine saurere Reaktion als außen, so daß die permeierten Farbmoleküle dissoziieren, somit wird also für die Moleküle stets ein Konzentrationsgefälle von außen nach innen aufrechterhalten. Dieses Gefälle ist um so größer, je saurer der Zellsaft ist, wenn das Außenmedium immer alkalischer wird. Von allen „Kurzfärbungen“ und „Sofortuntersuchungen“ „leerer“ Zellsäfte sind diese Bilder bekannt. Vielleicht wird in unserem Falle durch die „Bindung“ der Farbionen — von denen wir ja nur das Kation als Farbträger basischer Farbstoffe sehen können — an die Fettsäuren deren kolloidaler Charakter verändert, weil ihre Ladungen durch Adsorption der Ionen abgesättigt werden. Sie entmischen sich. Damit wandelt sich die diffuse Vakuolenfärbung in eine „Tröpfchenspeicherung“. Das zeigen die Versuchsreihen etwa vom 2. und 3. Tag ab. Eine weitere Aufnahme von Farbmolekülen erfolgt nicht, da inzwischen alle verfügbaren Fettsäuren mit Farbionen abgesättigt sind. Aber auch dieser Zustand der „Tröpfchenfärbung“ wird nicht beibehalten. Die Versuche zeigen eindeutig, daß vom 5. Tag ab sowohl die Zahl als auch die Größe der Farbtröpfchen abnimmt. Dafür könnte man folgende — wenn auch sehr hypothetische — Erklärungen geben:

a) Aus der elektroadsorptiven Bindung wird eine chemische noch unbekannter Natur. Mit einer solchen schwachen Bindung geht aber die den Farbionen

eigene Fähigkeit zur Fluoreszenz verloren. Sie sind also noch im Zellsaft enthalten, uns fehlt nur eine Methode, um sie zu erkennen.

b) Aus der elektroadsorptiven wird wiederum eine chemische Bindung, damit ist der Ionen-Charakter aufgehoben und die „Fettsäuren-Farbmoleküle“ können in das Außenmedium permeieren auf Grund des nun herrschenden Gefälles innen/außen. Auch in diesem Falle sind sie nicht mehr erkennbar. Wenn die Farbmoleküle wieder als solche austreten würden, müßte dies durch laufende Messungen der Farbkonzentration in den Kulturschalen nachzuweisen sein. Wohl ist nach dem Einsetzen der Mycelien in die Petrischalen ein sofortiger Rückgang der Farbkonzentration photometrisch festzustellen, doch steigt die Kurve in den nächsten Tagen nicht wieder an, sondern zeigt nach dem ersten steilen Abfall dauernd einen weiteren schwachen Abfall. Der Abfall wird um so stärker, je höher der pH-Wert liegt. Es findet hier sowohl ein Ausflocken der Farbmoleküle als auch eine Adsorption an den Glaswänden der Schalen statt. Diese Menge kann und wird der Größenordnung nach die zu erwartenden Meßwerte überdecken.

In beiden Fällen sind aber die Stoffe, die eine Speicherung in der Vakuole überhaupt erst ermöglichen, weil sie das Konzentrationsgefälle aufrechterhalten, nicht mehr oder doch nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form vorhanden. Jetzt kann im Innern der Vakuole maximal nur eine Farbkonzentration wie im Außenmedium herrschen. Normalerweise bleibt die Konzentration im Innern aber doch unter der des Außenmediums. Eine Färbung ist damit nicht erkennbar.

2. Die ungefärbten Vakuolen besitzen in allen pH-Bereichen eine ausgesprochen deutliche blaue Primärfluoreszenz. Diese zeigen auch die Vakuolen von *Achlya*, die zwar in Farblösungen liegen, aber unterhalb des pH-Bereiches, in denen eine Vakuolenfärbung auftritt. Nach der diffusen Vakuolenfärbung, ihrer Entmischung zu Tröpfchen und deren Verschwinden bleibt aber die Vakuole fluoreszenzoptisch leer. Daraus läßt sich vielleicht schließen, daß die Primärfluoreszenz von den Inhaltsstoffen stammt, die einmal die Farbspeicherung ermöglichen und die nun — wie vorn gesagt — aus dem Zellsaft permeieren oder durch die chemische Veränderung auch (wie die Farbkationen) ihre Fluoreszenzeigenschaft verloren. Ungeklärt bleibt vorerst noch, weshalb auch in den Vakuolen, die nicht sichtbar den Farbstoff speicherten, die Primärfluoreszenz etwa mit dem 6. Tag nachläßt und dann später aufhört. Oder sollten hier noch Stoffe aus dem Kulturmedium permeieren, die wir nicht kontrollieren können und die eine Änderung (Entmischung?) der Kolloide im Zellsaft bewirken?

3. In den Versuchsreihen ist auffällig, daß sich jeder Neuzuwachs an Hyphen der ersten Ausgangsrassen und alle Hyphen der Tochterkulturen nicht sichtbar färben, obwohl sie in den gepufferten Farblösungen wachsen. Ausgenommen sind die absterbenden oder abgestorbenen Hyphen, von denen aber in den Tochterkulturen kaum eine vorhanden ist. Auch hier kann man zwei Wege vermuten:

a) Entsprechend den Erörterungen unter 1 beginnt ja schon mit der Anlage der Tochterkulturen eine Farbspeicherung in den Vakuolen, soweit sie in pH-Bereichen oberhalb von  $\text{pH} = \text{etwa } 5$  wachsen. Es werden also hier die vorn gezeigten Veränderungen — diffuse Vakuolenfärbung, Tröpf-



chenspeicherung, Verschwinden der Tröpfchen — vor sich gehen. Das geschieht aber schon zu einer Zeit, wo man vom extramatrikalen Mycel noch wenig sieht. Der Färbe- und Entmischungsvorgang ist also längst abgeschlossen, wenn man bei der Fluoreszenzkontrolle die aus dem Köder herauswachsenden Hyphen betrachtet.

b) Eine weitere Erklärung wäre die folgende: Diese Art der Saprolegnien ist dafür bekannt (s. d. Einleitung), daß sie Habitats mit einer weiten pH-Spanne bevölkern kann, es ist eine der „panaciden“ Arten. Man könnte vermuten, daß sich diese Art bei der Kultur in den gepufferten Kulturmedien mit und ohne Farbe dem jeweiligen pH-Milieu angleicht, daß sich also vor allem der Zellsaft auf die neuen pH-Verhältnisse einstellt. Setzt man diese Fähigkeit voraus, dann müßte letzten Endes eine Änderung der cH des Zellsaftes experimentell nachweisbar sein. Es müßte sich der Umschlagsbereich Membran/Vakuole — denselben Farbstoff vorausgesetzt — auf der pH-Skala verschieben. Für den vorliegenden Fall hieße das, der Beginn der Vakuolenfärbung müßte sich vom pH = 5 nach oben oder unten merklich entfernen. Das konnte aber in keinem Fall nachgewiesen werden.

Es wurden zu diesem Zweck *Achlya*-Kulturen für längere Zeit auf Ködern in Petrischalen bei verschiedenen pH-Werten kultiviert. Eine Färbung mit Akridinorange bei verschiedener cH ergab aber immer wieder denselben Bereich von etwa pH = 5, in dem in der Vakuole eine Farbspeicherung sichtbar wurde oder in dem eine Vakuolenkontraktion anzeigte, daß die Farbaufnahme einsetzt.

4. Bei allen „Sofortuntersuchungen“ — nicht bei den „Langfärbungen“ — ist eine Plasma- und Kernfärbung deutlich zu sehen. Sie zeigt dabei kein sehr intensives Leuchten, doch ist es stärker als bei einer reinen Imbibitionsfärbung. Der Farbton bewegt sich zwischen Grün und Gelblich-hellgrün, abgesehen von den stark sauren Bereichen, in denen eine echte Imbibitionsfärbung am kaum wahrnehmbaren graugrünen Farbton kenntlich ist. Diese Färbung hat folgende zwei Gründe:

a) Geht man von der Tatsache aus, daß das Protoplasma der Aufnahme dissoziierter Stoffe einen erheblichen Widerstand entgegensetzt und die Farbmoleküle in die Vakuolen permeieren, so wird eine Färbung des Plasmas nur eintreten können, wenn die Vakuole bereits abgesättigt ist, wenn auf Grund ihrer cH kein Gefälle außen/innen besteht oder das Plasma besonders reich an Lipoiden ist. In dem Bereich zwischen pH = 5–6 ist die Vakuole auf Grund ihrer cH nicht in der Lage, die Farbmoleküle zu „speichern“. Eine sehr leichte Vakuolenkontraktion deutet aber darauf hin, daß die Permeation beginnt. In diesem Bereich besteht aber noch keine ausgesprochene Speicherkonkurrenz zwischen Protoplasma und Vakuole. Das Plasma ist hier in der Lage, sichtbar die Farbmoleküle in seiner lipophilen Phase zu speichern. Die entstehenden Wachstumshemmungen sind im Vergleich zu den ungefärbten Kulturen gering. Morphologische Veränderungen ergaben sich nicht, die Entwicklung ist nur um etwa 24–48 Stunden verzögert. Es liegt in diesem Bereich also eine schwache, aber deutliche, durchaus vitale Plasmafärbung in der lipophilen Phase vor. Nach



Umsetzen dieser Kulturen in ungefärbte Kulturschalen derselben cH tritt langsam eine völlige Entfärbung ein.

b) Auf ganz anderem Mechanismus beruht aber die Plasmafärbung im Bereich von pH=6 und darüber. Die Vakuolen speichern den Farbstoff außerordentlich intensiv. Sehr starke Vakuolenkontraktion zerstört völlig die ursprüngliche zerklüftete Form des Vakuoms, obwohl die Plasmaströmung bis kurz vor pH=8 noch erhalten bleibt. Mit dieser Vakuolenkontraktion geht schon eine schwerwiegende Schädigung einher, die zwar um pH=6 nur in einer Entwicklungsverzögerung besteht, die aber bereits bei pH=7 die Bildung der asexuellen Reproduktionsphase stark beeinträchtigt und die sexuelle Phase völlig unterbindet. Über pH=8 ist auch eine starke Hemmung des vegetativen Wachstums zu verzeichnen<sup>1</sup>. Das von pH=6 ab stark gefärbte Mycel besitzt also gar nicht mehr seine volle Lebensfähigkeit. Damit ist aber der Lebenszustand der Zellorganelle höchstens noch als „postvital“ zu bezeichnen. In diesem Zustand aber werden die Plasmagrenzschichten auch für Farbstoffe permeabel, wie Höfler (1952) an Lebermoosen zeigen konnte, und damit treten neben Molekülen auch Kationen sowohl von außen her wie auch auf ihrem Wege durch das Protoplasma und von der Vakuole her in das Protoplasma über. Sie beschleunigen nun lebenswichtige Carboxylgruppen und beschleunigen damit den Zelltod.

Die Vorgänge bei Langfärbungen machen davon keine Ausnahme, doch herrscht hier im Außenmedium eine so geringe Farbstoffkonzentration (1 : 100.000 oder 1 : 500.000), daß die Vakuolen die in der Umgebung des Mycels vorhandenen Farbmoleküle weitgehend verarbeiten können. Auch hier kommt es zu Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen. Sie können aber bald wieder eingeholt werden, sobald die Vakuolen keine Stoffe mehr enthalten, die zur Farbspeicherung erforderlich sind, wie vorn unter 1 näher ausgeführt wurde.

5. Wenn die Vakuolen aber die Fähigkeit haben, Moleküle zu speichern und umzuwandeln, so doch wahrscheinlich, um der Nährstoffaufnahme und nicht etwa der Farbstoffaufnahme allein zu dienen. Würden diese Stoffe aber durch die vorn geschilderten Vorgänge aus dem Stoffwechselgeschehen ausgeschaltet werden, müßte man annehmen, daß damit auch die Nährstoffaufnahme zumindest stark in Mitleidenschaft gezogen wird. Das ist an den Entwicklungsverzögerungen zu erkennen. Der Nachweis ist aber nur zu erbringen, wenn man einen Pilz im Kulturmedium frei schwimmend kultiviert. Bei den vorliegenden Versuchen saß die *Achlya* auf einem Köder (gekochtem Hanfsamenstück) und konnte durch Stoffleitung weitgehend ihren heterotrophen Stoffwechsel aufrechterhalten.

6. Aus dem Vorstehenden läßt sich methodisch folgendes herauschälen:

a) Jede Vitalfärbung bedeutet einen erheblichen Eingriff in das Lebensgeschehen der Zellen. Der angewandten Methode bleibt es überlassen, diesen Eingriff auf ein Mindestmaß herabzudrücken, um aus den Färbungen

<sup>1</sup> Derartigen Giftwirkungen werde ich den nächsten Beitrag widmen.

wirklich einen sicheren Schluß auf die Tätigkeit „lebenden“ Protoplasmas ziehen zu können.

b) Es ist bei Vitalfärbungsstudien unbedingt notwendig, die Objekte längere Zeit zu beobachten. Schwierigkeiten bestehen bei Gewebeschnitten. Deshalb sollte man seine Aufmerksamkeit mehr Objekten zuwenden, die eine Weiterkultur ermöglichen.

c) Ohne die bisher erarbeiteten Grundlagen der Vitalfärbung zu kennen, sollte man keine Vitalfärbungen vornehmen und noch weniger versuchen, sie dann zu interpretieren.

7. Als wichtigstes Ergebnis sei festgestellt, daß das lebende Protoplasma der Ionenaufnahme erheblichen Widerstand entgegensetzt. Ein Eindringen von Ionen wird erst möglich, wenn durch starke Farbspeicherung in der Vakuole die Plasmagrenzschichten für Ionen permeabel werden.

Als die vorstehende Arbeit bereits abgeschlossen war, erhielt der Verfasser durch zwei Vorträge auf der „Pflanzenschutztagung 1953“ in Heidelberg davon Kenntnis, daß durch Untersuchungen von Wilhelm (1953) und Haeßler (1953) eindeutig der Beweis erbracht werden konnte, daß bei Anwendung von Schwefelpräparaten im Weinbau zur Bekämpfung des Oidiums eine ähnliche Aufnahme des molekularen Schwefels stattfindet. Alle bisherigen Annahmen über die Wirkung des Schwefels gingen dahin, daß der Schwefel vor seiner Aufnahme durch den Pilz in eine dissoziierbare Verbindung überführt wird. Jetzt steht fest, daß alle diese gefundenen Verbindungen (in der Hauptsache  $H_2S$ ) nur dann auftreten, wenn auf der Wirtspflanze der Parasit vorhanden ist, und nur dieser scheidet z. B.  $H_2S$  aus, nachdem er molekularen Schwefel aufgenommen hat.

So gewinnen die vorliegenden Untersuchungen eine besondere Bedeutung bei der Erforschung der Wirkungsmechanismen der heutigen Fungizide. Vorversuche haben gezeigt, daß — abgesehen von den Kupferpräparaten, bei denen man heute nur von einer „Ionenwirkung“ auf das Plasma der Pilze spricht — die organischen Fungizide nicht oder nur schwer dissoziierbare Verbindungen darstellen und nur als Moleküle aufgenommen werden und dann erst im Innern des Pilzes zur Wirkung kommen. Wahrscheinlich wird auch die Aufnahme des Kupfers in die Pilzzelle als Molekül — wohl als eine Komplexverbindung zwischen Cu und Ca — nachweisbar werden. Über die Wirkung im Innern bestehen aber heute noch recht unterschiedliche Meinungen.

### E. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. An der Saprolegniacee *Achlya racemosa* wird während ihres gesamten Entwicklungsganges das Verhalten der beiden Farbstoffe Neutralrot und Akridinorange untersucht.

2. Weder mit Neutralrot noch mit Akridinorange tritt eine im Hellfeld oder im Fluoreszenzlicht sichtbare Membranfärbung auf. Membranfärbungen sind nur an Mycelgemmen (anderer Saprolegniaceen-Arten), an den Tüpfelmembranen der Oogonien oder an der Trennwand Hyphe/Sporangium zu erhalten. Hierbei handelt es sich um eine chemische Bindung und keine Elektroadsorption von Farbkationen.

3. Ab  $\text{pH} = 5$  beginnen die Vakuolen der *Achlya* die Farbmoleküle zu speichern. Der Beginn der Farbspeicherung ist am Auftreten der Vakuolenkontraktion zu erkennen, später beim Neutralrot im Hellfeld an der diffusen satten Rotfärbung, die im Fluoreszenzlicht unsichtbar bleibt. Beim Akridinorange ist die diffuse Vakuolenfärbung im Hellfeld gelbbraun und im Fluoreszenzlicht kupferrot. Die diffuse Vakuolenfärbung entmischt sich bald zu Farbtröpfchen, die nach etwa 6 Tagen verschwinden.

4. Vom  $\text{pH}$ -Bereich um 6,0 ab tritt eine mehr oder weniger deutliche, nur im Fluoreszenzlicht sichtbare Plasma- und Kernfärbung auf.

5. Die „Kurzfärbungen“ ergeben Färbungsbilder, die aus der Vitalfärbungsliteratur bekannt sind. Langfärbungen lassen dagegen deutliche Umwandlungen bei täglicher Kontrolle erkennen. So verschwindet die „Plasmafärbung“ bereits innerhalb von 5 Tagen. Aus der diffusen kupferroten (beim Akridinorange) Vakuolenfärbung wird schon nach 3 Tagen eine „Tröpfchenspeicherung“, die nach weiteren 3 Tagen, also nach etwa 6 Tagen, verschwindet. An Neuzuwachs der Kulturen, soweit sie in der Farblösung wachsen, ist überhaupt keine Färbung erkennbar.

6. Auf Grund der Untersuchungen wird festgestellt, daß jede Form der Vitalfärbung einen erheblichen Eingriff in das Zellgeschehen darstellt. Allein der Methodik bleibt es vorbehalten, diese Schäden auf ein Mindestmaß herabzusetzen.

7. „Kurzfärbungen“ sollten nicht oder nur in Verbindung mit langdauernden Versuchen zur Klärung der Probleme der Stoffaufnahme herangezogen werden.

8. Eindeutig ließ sich erkennen, daß lebendes Protoplasma der Ionenaufnahme erheblichen Widerstand entgegensetzt. Eine Aufnahme von Ionen kann erst erfolgen, wenn die Grenzschichten geschädigt werden.

9. In Vitalfärbungsversuchen auftretende Plasma- (und Kern-) Färbungen sind nur in schwach sauren  $\text{pH}$ -Bereichen reversibel, wenn sich Farbmoleküle in der lipophilen Phase des Protoplasmas anreichern. Das ist aber in der Regel nur so lange möglich, wie keine Konkurrenzkongruenz zwischen Protoplasma und Vakuole besteht. Alle Plasmafärbungen neben einer Vakuolenfärbung stellen irreversible Schädigungen des Protoplasten dar.

10. Die Untersuchungen heben hervor, daß in erster Linie nur Moleküle in die Zelle eindringen können. Sie gewinnen eine wesentliche Stützung durch die Ergebnisse von Wilhelm und Haeßler, die beide — unabhängig voneinander — nachweisen konnten, daß bei der Bekämpfung des Oidiums im Weinbau der verwendete Schwefel als S-Molekül wirksam wird und nicht, wie bisher vermutet wurde,  $\text{H}_2\text{S}$  oder eine Thioschwefelsäure.

11. Die Untersuchungen werden in einem anderen Rahmen fortgesetzt. Die Methodik und die damit gewonnenen Erkenntnisse sollen der Klärung der Wirkungsmechanismen von Fungiziden dienen.

## Literatur

- Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 132, 91—124.
- 1938: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 56, 123—131.
- 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. IV. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration des Zellsaftes und des Außenmediums auf die Harnstoffaufnahme. *Planta* 35, 279—300.
- 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. *Naturforsch.* 3b, 112—120.
- 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 40, 85—106.
- Dubitzky, I., 1954: Protoplasma und Vakuolenfiguration bei *Saprolegnia*. *Z. f. univ. Mikr.* 51, 213.
- Grohrock, E., 1935: Über die Umhütung isolierter Protoplaststücke. Untersuchungen an *Saprolegnia*. *Planta* 23, 313—339.
- Guilliermond, A., 1920: Observations vitales sur le chondriome d'une *Saprolegniacée*. *C. r. Acad. Sci. Paris* 170, 1329.
- 1922: Observation cytologique sur un *Leptomit* et en particulier sur le mode de formation et la germination des zoospores. *C. r. Paris* 175, 377.
- 1927: Sur l'action du rouge neutre sur les cellules végétales et sur la coloration vitale du vacuome. *Bull. hist. Phys. et Path.* 4.
- 1930: Sur la formation des zoosporanges et la germination des spores chez un *Saprolegnia*, en cultures sur milieux nutritiv additions de rouge neutre. *C. r. Acad. Sci.* 190, 384.
- G. Mangelot et L. Plantefol, 1935: *Traité de Cytologie végétale*. Paris, 1195 S.
- et R. Gautheret, 1937: *Cytophysiologie végétale*. Sur les Conditions dans lesquelles se produit la coloration vitale des vacuoles par le rouge neutre. Institut de France. *Académie de Sciences C. r. Acad. Sci.* 204, 1377, 1—4.
- Haeßler, H.: Chemische Vorgänge bei der Einwirkung von Schwefel auf *Oidium*. (Vortrag, gehalten auf der Pflanzenschutztagung 1953 in Heidelberg.)
- Höfler, K., und E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. *Österr. Bot. Z.* 94, 99—127.
- 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? *Z. Mikrosk.* 2, 13.
- 1952: Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 54, 183—187.
- Höhnk, W., 1954/55: *Saprolegniales* und *Monoblepharidales* aus der Umgebung Bremens mit besonderer Berücksichtigung der Ökologie der *Saprolegniaceae*. *Abh. Nt. Ver. Brem.* 29, 207—237.
- Hofmeister, L., 1948: Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin. *Sber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I*, 157, 55—82.
- Johannes, H., 1939: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien I. *Flora* 34, 58—104.
- 1941: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien II. Die Inturbanz der Färbungen mit Rhodaminen. *Protoplasma* 36, 181—194.
- 1950: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien III. Die Vitalfärbung des *Phycomyces Blakesleeanus* mit Akridinorange. *Arch. Mikrobiologie* 15, 13—41.

- Joyet-Lavergne, Ph., 1928: Pouvoir oxydant, chondriome et sexualisation cytoplasmiques chez les champignons. C. r. Acad. Sci. 186, 894—896.
- 1928: La sexualisation cytoplasmique et les caractères physico-chimiques de la sexualité. Protoplasma 3, 357.
- 1931: La physico-chimie de la sexualité. Berlin. Protoplasma-Monographie V.
- 1932: Sur les caractères de sexualisation cytoplasmiques d'un champignon: *Pythium de Baryanum*. C. r. Acad. Soc. Biol. 111, 588—589.
- 1932: Pouvoir oxydant, chondriome et sexualisation cytoplasmique chez les champignons. C. r. Acad. Sci. 196, 894.
- 1934: Sur la sexualisation cytoplasmiques chez les levures a conjugation hétérogamique. C. r. Acad. Sci. 198, 1071—1074.
- Kinzel, H., 1932: Der Entladungspunkt pflanzlicher Zellwände und seine Abhängigkeit von deren Pektin Gehalt. Anz. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., 1932, Nr. 15, 1—5.
- 1933: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma 42, 209.
- Küster, E., 1940: Neue Objekte für die Untersuchung der Vakuolenkontraktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 58, 413.
- Lund, A., 1934: Studies on Danish freshwater *Phycomycetes* and notes on their occurrence particularly relative to the hydrogen ion concentration of the water. Mem. Acad. R. Sc. e. Lett. Dänemark 6, 6. Ser., Nr. 1.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2, 179.
- Raper, J. R., 1937: A method of freeing fungi from bacterial contamination. Science 85, 540.
- Saksena, R. K., und K. S. Bhargava, 1946: Some cytological observations on spore formation in *Thraustotheca clavata*. Mycologia 38, 554—564.
- Strugger, S., 1935: Beiträge zur Gewebephysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 24, 108—127.
- 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56—96.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. Naturwiss. 73, 97—134.
- 1940: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 54, 601—608.
- 1940: Die Vitalfärbung der Chromosomen. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 48, 645—646.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover, 1—194, Taf. I—III.
- Wilhelm, A. F.: Worauf beruht die Wirkung des Schwefels bei der Oidiumbekämpfung? (Vortrag, gehalten auf der Pflanzenschutztagung 1953 in Heidelberg.)

## Eiweißspindeln in *Opuntia monacantha f. variegata*

Von

Griseldis Kenda

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 28. April 1954)

Weingart (1920) erbrachte den Nachweis, daß die Panaschierung von *Opuntia monacantha* How. *f. variegata* infektiöser Natur ist. Er pflanzte einen Sproß einer panaschierten Pflanze auf eine grüne, im darauffolgenden Sommer trat eine Weißfleckung auf. Rosenzopf (1951), Weber und Kenda (1952), Miličić (1954), Weber (1954) vertreten die Ansicht, daß die seit Molisch (1890) bekannten „Eiweißspindeln“ der Kakteen Viruskörper sind, obwohl an den Pflanzen äußerlich vielfach keine Krankheitssymptome in Erscheinung treten. Wenn diese Auffassung richtig ist, so war zu erwarten, daß in den Zellen der an infektiöser Chlorose leidenden *Opuntia monacantha f. variegata* Eiweißspindeln zu finden sein müßten. Tatsächlich hat bereits Gicklhorn (1913) für *Opuntia monacantha* das Vorkommen von Eiweißspindeln festgestellt. Gicklhorn erwähnt nichts davon, daß die von ihm untersuchte Pflanze buntstämmig gewesen wäre. Weber, Kenda und Thaler (1952) haben ein panaschiertes Exemplar dieser Opuntie aus dem Botanischen Garten der Universität Graz untersucht und auch in diesem Eiweißspindeln gefunden. Die Arbeit von Weingart, der den infektiösen Charakter der Panaschierung dieser Kaktee nachgewiesen hat, war den Autoren damals nicht bekannt. Gicklhorn (1913) hat die Eiweißspindeln im Rindenparenchym und im Mark der Opuntie gefunden. Weber, Kenda und Thaler sahen sie auch in den Epidermiszellen „allerdings seltener“. Eine neuerliche Untersuchung von *Opuntia monacantha f. variegata*, und zwar der gleichen Pflanze, die vor drei Jahren daraufhin geprüft worden ist, zeigte ein massenhaftes Auftreten von Eiweißspindeln gerade in den Epidermiszellen; besonders groß sind die Spindeln in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates (Abb. 1). Vielfach wurden in ein und derselben Zelle Eiweißspindeln und die von Weber, Kenda und Thaler (1952) zuerst beschriebenen Eiweißstachel-



kugeln aufgefunden. Die Eiweißspindeln treten nicht nur in den weißen Arealen und Sproßgliedern der panaschierten Kakteen auf, sondern auch in den grünen. Es ist für verschiedene an infektiöser Panaschierung erkrankte Pflanzen bekannt, daß einzelne Blätter oder Sproßteile ausheilen können, das heißt, die Buntfleckigkeit verlieren und rein grün werden. Vielfach bleiben aber auch solche Teile infektiös. Durch die Feststellung, daß in den äußerlich gesund erscheinenden Sprossen Eiweißspindeln vorhanden sind, wird das Persistieren des Infektionsstoffes mikroskopisch sichtbar. Es werden ja die Eiweißspindeln heute als Virus-Eiweißkörper aufgefaßt.

Bawden (1950) vermutet, es könnte durch die Bildung von Virus-Kristalloiden in den Zellen das Virus inaktiviert und unschädlich gemacht werden. „It is probable, that the inclusions do contain proteins capable of uniting with the virus and rendering it insoluble. Any such combination might also be expected to act in part as a protective mechanism, for it is likely that the biological activity of the virus would be reduced by being rendered insoluble.“ Vielleicht wird es dadurch verständlich, daß gerade in grünen, also äußerlich ausgeheilten Sproßstücken der panaschierten Opuntie besonders viele Eiweißspindeln und Eiweißstachelkugeln vorhanden sind.

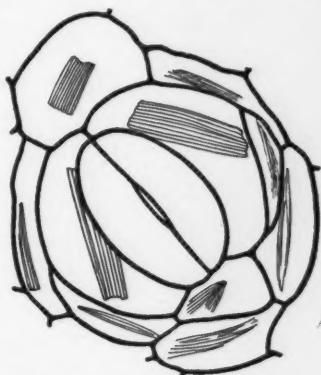


Abb. 1. Eiweißspindeln in Epidermiszellen von *Opuntia monacantha* f. *variegata*.

## Zusammenfassung

In den Zellen der an infektiöser Panaschierung leidenden *Opuntia monacantha* f. *variegata* sind in weißen und grünen Sprossen und Sproßarealen zahlreiche Eiweißspindeln vorhanden. Das spricht für die Virus-Natur der Kakteen-Eiweißspindeln.

## Literatur

- Bawden, F. C., 1950: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham, Mass.  
 Gicklhorn, J., 1915: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. Österr. Bot. Z. 63.  
 Miličić, D., 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. Protoplasma 45.  
 Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper? Phytion 5.  
 Weber und Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41.  
 — Kenda und Thaler, 1952: „Stachelkugeln“ in *Opuntia*. Phytion 4.  
 Weber, F., 1954: Kakteen-Virus-Übertragung durch Pfropfung. Protoplasma 43.  
 Weingart, W., 1920: Buntgefleckte Kakteen. Monatsschr. Kakteenkunde 30.  
 Protoplasma, Bd. XLIV/2

# Vitalfärbestudien an Euglenaceen

Von

Alfred Diskus

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 9 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Februar 1954)

## Einleitung

Die Eugleninen erweckten durch ihre eigenartige Organisation schon früh das Interesse zahlreicher Forscher. Ihre Stellung im System ist ziemlich isoliert. Ehrenberg (1831 und 1833) trat für die tierische Natur dieser Organismen ein, während eine große Anzahl älterer Autoren, wie Carter (1856), Stein (1878) und Schmitz (1884) bereits die vegetabilische Organisation der Euglenen betonten. Die Arbeiten dieser Autoren lieferten vorwiegend systematisch-morphologische Erkenntnisse.

Klebs (1883, 1895) hat dann neben der Morphologie die wesentlichen physiologischen Eigenschaften der *Euglena*-Zelle geklärt und die physiologische Bearbeitung dieser Flagellaten angeregt. Jennings (1910), Ternetz (1912), Oltmanns (1917) und Bolte (1920) arbeiteten vorwiegend reizphysiologisch. Daneben war die Frage der Kultivierbarkeit und Ernährungsweise der Eugleninen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Zumstein 1900, Ternetz 1912, Pringsheim 1912, Mainx 1927). In jüngster Zeit haben K. u. L. Höfler (1952) und K. Hilmbauer (1954) das Osmoseverhalten einiger Euglenen untersucht.

Vitalfärberisch wurde mit Eugleninen noch wenig gearbeitet. Neben Klebs (1883) haben sie vor allem P. A. Dangeard (1902), P. Dangeard (1924) und Günther (1927) färberisch untersucht.

Eine große Anzahl von Vitalfärbestudien an verschiedenen Pflanzen hat in neuerer Zeit so wichtige Erkenntnisse über die chemisch-physikalischen Grundlagen der Färbbarkeit geliefert, daß eine vitalfärberische Untersuchung der Eugleninen unter Berücksichtigung moderner Methoden und Erkenntnisse gerechtfertigt scheint. Solche Vitalfärbestudien sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### Material und Methodik

Für meine Versuche an Eugleninen wurden Vertreter der Gattungen *Euglena*, *Phacus* und *Lepocinclis* verwendet. Es wurde mit zahlreichen Spezies experimentiert. Ich habe an verschiedenen Stellen der Umgebung von Wien und in einigen Orten in Niederösterreich (Ulmerfeld, Euratsfeld) gesammelt und war in der Lage, stets gutes Material für meine Versuche zu verwenden. Die Proben wurden in lichten, nordseitig gelegenen Fenstern des Institutes aufgestellt, empfindlichere Proben im Fließwasserbecken aufbewahrt. Bei zeitweiliger Erneuerung des Standortswassers konnten die verschiedenen Eugleninen lange Zeit lebend und gesund erhalten werden.

Zur Vitalfärbung habe ich eine größere Anzahl basischer Farbstoffe verwendet: Neutralrot, Neutralviolett, Brillantkresylblau, Toluidinblau, Thionin, Cresylechtviolett, Vesuvin und Rhodamin B. Es wurde meist mit einer Verdünnung von 1:10.000 gearbeitet. Zur Pufferung der Farbbäder dienten die üblichen Phosphatpuffer. Für eine genaue Messung der pH-Werte bei den Versuchen zur Bestimmung eines IEP stand mir ein Ionometer von Lautenschläger zur Verfügung. Ansonsten wurden dazu Farb-indikatoren (Merkscher Universalindikator, Tropäolin) verwendet.

### Der Periplast

Die Eugleninen sind durch den Besitz einer von der Membran aller übrigen Pflanzen stark verschiedenen Körperhülle ausgezeichnet. Die Zellwände sind, trotz ihrer unterschiedlichen chemischen Natur, stets tote Gebilde. Die Körperhülle der Euglenen ist wie das Plasma ein lebender Bestandteil der Zelle, welcher bei der Zellteilung nicht neu gebildet, sondern selbständig mit geteilt wird (Klebs 1883, S. 403, Fritsch 1948, S. 12, 91, 725). Klebs prägte 1893 den Ausdruck Periplast für die Körperhülle der Euglenen. Er versteht darunter eine vom Cytoplasma deutlich abgesetzte, von diesem im lebenden Zustand nicht trennbare Zellumhüllung. In neuerer Zeit wird unter Periplast die Körperhülle der Euglenen als morphologische Einheit zweier funktionell verschiedener Teile — der Pellicula und der kontraktilen Wandplasmaschicht — verstanden (vgl. Fritsch 1948, K. u. L. Höfler 1952).

Jüngst hat Pochmann (1953) die Struktur-, Wachstums- und Teilungsverhältnisse des Periplasten der Eugleninen eingehend bearbeitet.

Klebs hat gezeigt, daß der Periplast aus zwei chemisch verschiedenen Substanzen besteht, welche je nach der Spezies in verschiedenem Mengenverhältnis die „Membran“ aufbauen: Bei stark metabolischen Formen mit zartem Periplasten (z. B. *Euglena viridis*) überwiegt ein leicht färbbarer, stark quellender, dehnbarer und durch Pepsin verdaulicher „Eiweißstoff“, während bei starren Formen (z. B. *Phacus pleuronectes*) ein nicht färbbarer, wenig quellbarer, undehnbarer und unverdaulicher „Membranstoff“ die Körperhülle zum Hauptteil zusammensetzt. Zwischen diesen Extremen bewegen sich die verschiedensten Zwischenstufen der Membranen der übrigen Arten (Klebs 1883, S. 242).

Auf Grund der chemischen und funktionellen Besonderheiten des Periplasten schien vorerst das Färbeverhalten dieses Zellteiles von Interesse.

Die erste grundlegende Beobachtung darüber stammt von Klebs (1885). Bei Färbung von Euglenen mit Kongorot fand er ein spezifisch verschiedenes Verhalten der Zellwände höherer Pflanzen und der „Membran“ der Euglenen. Jene färben sich rot an, gleichgültig, ob die Zellen leben oder tot sind. Die Körperhülle von *Euglena* dagegen färbt sich nur, wenn die Zelle getötet wird. Klebs hatte Euglenen wochenlang in 0,05%iger Kongorotlösung gehalten, ohne eine Spur einer Färbung zu sehen. Eine solche trat erst nach Tötung der Zellen ein.

Die Körperhülle der Euglenen zeichnet sich durch ihre relativ geringe Fähigkeit aus, Farbstoffe einzulagern. Sie ist an *Euglena viridis* mit Karminpräparaten noch deutlich färbbar, während bei den starren *Phacus*-Arten eine solche Färbung nicht mehr gelingt. Die einzelnen Arten verhalten sich dabei recht verschieden (Klebs 1885, S. 241).

Günther (1927) berichtet über Vitalfärbung des Periplasten an *Euglena terricola* und *Euglena geniculata* mit Methylenblau. Nach seinen Angaben färbt ein bestimmter Farbstoff bei einer Art den Periplasten, bei anderen Formen dagegen nicht, doch färben sich andere Zellteile. Mit mehreren Farbstoffen (Neutralrot, Eosin, Jodgrün, Cresylechtviolett, Orange G, Vesuvin, Säurefuchsin, Rose bengale und Erythrosin) erzielte er an *Euglena geniculata* und *Euglena proxima* vitale Plasmafärbung.

Über die Wirkung von Farbbädern von verschiedenem pH finden sich bei den älteren Autoren naturgemäß noch keine Angaben. Heute sind wir durch eine große Anzahl von Arbeiten über die chemisch-physikalischen Grundlagen der Vitalfärbung gut informiert (Ruhland 1908, Czaja 1954, Strugger 1940, 1949, Drawert 1947—1951, Höfler 1947—1952, Wiesner 1951). Je nach der Wasserstoffionenkonzentration (pH) der Farblösung liegen die meisten basischen Vitalfarbstoffe entweder in molekularer oder in ionisierter Form vor. In das Plasma und in die Vakuolen können nur die lipoidlöslichen Moleküle eindringen. Den lipoidunlöslichen Ionen ist dieser Weg verschlossen, sie können lediglich an außerhalb des Plasmas gelegenen Zellteilen gespeichert werden.

Ausgehend von dieser grundlegenden Tatsache habe ich daher auf breiterer Grundlage Vitalfärbeversuche mit pH-gestuftem Farbbadreihen angestellt.

Ich beschreibe zunächst an Hand von pH-gestufteten Reihenversuchen mit Neutralrot 1 : 10.000 das Färbebild einiger Euglenaceen nach jeweils 10 Minuten Färbedauer (nach längerer Versuchsdauer ändert sich bisweilen das Färbebild. Es wird darauf noch zurückzukommen sein):

pH 2,5: Alle Zellen ungefärbt.

pH 3,2: Verschieden intensive, jedoch deutliche Rosafärbung des Periplasten bei *Euglena viridis*, *E. geniculata*, *E. deses*, *E. halophila*. *Phacus* und *Lepocinclis* bleiben ungefärbt.

pH 5,2: Periplastenfärbung in gleicher Weise wie bei pH 3,2. Einzelne Farbstofftröpfchen im Plasma von *Euglena viridis*, *E. deses* und *E. geniculata* zu sehen. *Phacus*- und *Lepocinclis*-Arten ungefärbt.

- pH 7: Periplast aller untersuchten Euglenen ungefärbt. Verschieden starke Tröpfchenspeicherung im Plasma, auch bei den starren Formen (*Phacus*, *Lepocinclis*).
- pH 8: Allgemein starke Tröpfchenspeicherung bei den lebhaft metabolischen Euglenen. *Euglena oxyuris*, *E. tripteris*, *Phacus*- und *Lepocinclis*-Arten haben den Farbstoff nur in geringem Maße gespeichert. Periplast bei allen untersuchten Arten ungefärbt.

Brillantkresylblau (1 : 10.000) färbt den Periplasten von *Euglena deses*, *E. geniculata* und *E. halophila* im Bereich von pH 3 bis pH 11 verschieden stark metachromatisch violett an. Eine Färbung der Körperhülle von *Phacus* und *Lepocinclis* wurde nicht beobachtet. Unterhalb pH 3 erfolgte bei allen untersuchten Euglenaceen keine Farbspeicherung. Tröpfchenspeicherung tritt in der Regel bei Brillantkresylblau von pH 5 bis pH 12,5 ein.

Mit Rhodamin B, einem elektroneutralen basischen Farbstoff, konnte ich in keinem Falle den Periplasten vital färben.

Die Färbung des Periplasten verschwindet stets nach Durchsaugen von 0,2 Mol  $\text{CaCl}_2$ , sie ist demnach, so wie die pflanzlicher Zellwände, eine elektroadsorptive Ionenfärbung. Es blieb nun zu untersuchen, ob bei entsprechend niedrigem pH der Farblösung ein Entladungspunkt (EP) zu erreichen ist oder ob der Periplast der Euglenen einen isoelektrischen Punkt (IEP) im Sinne von umladbaren Ampholyten besitzt.

Bestimmungen des IEP verschiedener Zellbestandteile sind mit Hilfe von Farbstoffpaaren (einem basischen und einem sauren Farbstoff) schon häufig durchgeführt worden (z. B. Pischinger 1926, Drawert 1937). Yamaha (1935) hat, wohl als erster, am Periplasten von *Euglena viridis* eine Bestimmung des IEP durchgeführt. Er fixierte die Zellen 2 Minuten lang in  $\text{OsO}_4$ -Dampf und färbte hierauf die Präparate 5 Minuten mit Erythrosin bzw. Methylviolet. Es ergab sich für den Periplasten ein IEP von pH 3,1 bis pH 3,2.

Für meine Versuche habe ich sowohl die Methode der Fixierung und Färbung mit einem Farbstoffpaar als auch Vitalfärbung mit pH-gestuftem Farbbadreihen und schließlich blockierte Farblösungen (nach Kinzel 1953) angewandt.

#### **Bestimmung des IEP am Periplasten von *Euglena geniculata* mit Hilfe eines Farbstoffpaares**

Die Zellen wurden in einem Schälchen mit 96%igem Alkohol fixiert. Dabei löst sich in bekannter Weise das Plasma vom Periplasten, was für die Beobachtung seines Farbverhaltens von Vorteil ist. Durch den Alkohol wird überdies das Chlorophyll herausgelöst, die Zellen werden gelblich bis farblos. Sie sammeln sich am Grunde des Schälchens in Massen an und können nun bequem in die entsprechenden Farblösungen — ich verwendete Säurefuchsin und Toluidinblau — übertragen werden. Nach 15 Minuten Färbedauer wurden die Zellen in Schälchen mit den entsprechenden Phosphatpufferlösungen ausgewaschen und sodann untersucht. Das mehrmalige Umpipettieren von der Alkoholfixierung in das Farbbad und von hier in

die Pufferlösungen brachte einen sehr großen Verlust an Zellen mit sich, weshalb bei Anwendung dieser Methode nur mit sehr reichlichem Material zu arbeiten ist.

Ich gebe den Verlauf der Färbungen an Hand eines Versuchsprotokolls wieder:

**Säurefuchsin 1:3000:**

- pH 2,04: Stärkste purpurrote Färbung von Zellinhalt und Periplasten.  
 pH 2,5: Sehr starke, purpurrote Färbung von Zellinhalt und Periplasten sowohl bei *Euglena geniculata* als auch bei einigen in den Proben enthaltenen *Astasien*. (Diese waren nach der Fixierung und Färbung nur noch durch das Fehlen des Stigmas von den Euglenen zu unterscheiden. Es ist bei den Euglenen erhalten geblieben und durch die Alkoholfixierung zu einem kleinen roten Tröpfchen zusammengefloßen [vgl. Wager 1900].)  
 pH 3,1: Periplast stark rot gefärbt, doch etwas heller als bei pH 2,5.  
 pH 3,6: Periplast aller Zellen meist farblos, bei wenigen noch zart rosa gefärbt.  
 pH 4,8: Alle Zellen ungefärbt.

**Toluidinblau 1:3000:**

- pH 6,2: Intensive dunkelblaue Färbung von Zellinhalt und Periplasten.  
 pH 4,8: Periplast und Plasma dunkelblau gefärbt.  
 pH 3,6: Periplast noch deutlich gefärbt.  
 pH 3,1: Der Großteil aller Zellen ungefärbt, an wenigen noch zartblaue Färbung des Periplasten.  
 pH 2,8: Alle Zellen ungefärbt.

Auf Grund dieser mehr orientierenden Versuche wurden sodann im Bereich von pH 5 bis pH 4 feinere pH-Abstufungen hergestellt. Neben *Euglena geniculata* wurde auch *Phacus pyrum* näher untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

++ = Starke Färbung des Periplasten.

— = Keine Färbung.

+— = Die Mehrzahl aller Zellen ungefärbt, wenige zart gefärbt.

pH	<i>Euglena geniculata</i>		<i>Phacus pyrum</i>	
	Säurefuchsin	Toluidinblau	Säurefuchsin	Toluidinblau
2,04	++	—	++	—
2,5	++	—	++	—
2,8	++	—	++	—
3,1	+	+—	+—	+—
3,35	+—	+	—	+
3,4	—	++	—	++
3,6	—	++	—	++

Der IEP des Periplasten von *Euglena geniculata* liegt demnach zwischen pH 3,1 und pH 3,5, der des Periplasten von *Phacus pyrum* um pH 3.

### Versuche mit blockierten Farbstofflösungen

Zur Bestimmung eines IEP am Periplasten von *Euglena deses* und *Euglena spirogyra* wurden blockierte Farblösungen verwendet. Diese haben gegenüber der vorhin angewandten Methode verschiedene Vorteile: Die Färbung ist vor allem vital, was im Gegensatz zur Färbung toter Gebilde



(Zellwände und Gallerten) von besonderer Bedeutung ist. Es kann auch mit weniger ergiebigem Material gearbeitet werden, da ein einmaliges Durchsaugen der Lösung durch das Präparat keinen allzu großen Verlust an weggeschwemmten Zellen mit sich bringt. Kinzel (1952) hat mit blockierten Farblösungen die Färbungspunkte verschiedener Algengallerten bestimmt. Er verweist dabei auf die Tatsache, daß beim Arbeiten mit gepufferten Farbstofflösungen die adsorptionsverdrängende Wirkung der Alkaliionen der Puffersalze ( $K^+$  und  $Na^+$ ) bisher stets unbeachtet blieb. Dieser unkontrollierbare Faktor fällt beim Arbeiten mit blockierten Farblösungen weg.

Als Vitalfarbstoff wurde Neutralrot (1:10.000) verwendet. Die Lösungen enthielten  $CaCl_2$  in gestuften Konzentrationen. Sie wurden nach den Angaben von Kinzel (1952) hergestellt.

Die Lösungen wurden gründlich durchgesaugt und hierauf wurde nach jeweils 10 Minuten beobachtet.

Neutralrot 1:10.000 mit:

- 0,0032  $CaCl_2$ : Deutliche Rosafärbung des Periplasten von *Euglena deses*. An *Euglena spirogyra* sind die Schleimhöcker auf der Pellicula besonders deutlich rot gefärbt.
- 0,0056  $CaCl_2$ : Periplast von *Euglena deses* schwach rosa tingiert. Deutliche Rotfärbung der Körperhülle von *Euglena spirogyra*.
- 0,01  $CaCl_2$ : Keine Färbung an *Euglena deses*. Periplast von *Euglena spirogyra* weiterhin gefärbt.
- 0,32  $CaCl_2$ : Periplast von *Euglena deses* ungefärbt, an *Euglena spirogyra* deutliche Rosafärbung.
- 0,1  $CaCl_2$ : Färbepunkt wie in 0,032 Mol  $CaCl_2$ . Hauptvakuole von *Euglena deses* etwas angeschwollen.
- 0,18  $CaCl_2$ : Periplast sowohl von *Euglena deses* als auch von *Euglena spirogyra* ungefärbt. Hauptvakuole bei beiden Arten angeschwollen.

Der Versuch zeigt, daß die Färbepunkte des Periplasten von *Euglena deses* und *Euglena spirogyra* weit auseinander liegen. Während die Körperhülle bei *Euglena deses* schon bei 0,01 Mol  $CaCl_2$  ungefärbt bleibt, tritt eine Entfärbung des Periplasten an *Euglena spirogyra* erst bei 0,18 Mol  $CaCl_2$  ein.

Ein Versuch mit pH-gestuften Lösungsreihen von Neutralrot (1:10.000, Färbedauer 15 Minuten) ergab:

- pH 3,2: Periplast von *Euglena deses* deutlich rosa gefärbt. An *Euglena spirogyra* sind besonders die Schleimhöcker auf der Pellicula intensiv rot gefärbt.
- pH 2,8: *Euglena deses* ungefärbt, *Euglena spirogyra* deutlich gefärbt.
- pH 2,12: Körperhülle von *Euglena spirogyra* weiterhin deutlich gefärbt. *Euglena deses* vollkommen ungefärbt.

Eine Färbung in noch niedrigeren pH-Stufen wurde wegen der nun bereits schädigenden Wirkung der zur Herstellung solcher pH-Bereiche notwendigen  $n/10$  HCl nicht durchgeführt. Der Unterschied im Färbeverhalten dieser beiden Euglenen geht aus den obigen Angaben klar hervor. Ein un-

mittelbarer Vergleich der Färbungspunkte in den mit  $\text{Ca}^{+}$ -Ionen blockierten Lösungen und den in den gepufferten Farblösungen ist wegen der zusätzlich blockierenden Wirkung der Alkaliionen der Puffersalze nicht statthaft. Es sei nur festgestellt, daß eine Entfärbung der Körperhülle von *Euglena spirogyra* mit H-Ionen in vitalen pH-Bereichen nicht möglich ist, während an *Euglena deses* ein IEP des Periplasten bei pH 3 erreicht wurde. Im Falle von *Euglena spirogyra* dürfte es sich um eine sehr starke elektro-adsorptive Bindung der Farbkationen an die Substanz des Periplasten handeln. Möglicherweise steht die starke Farbbindung mit der Fähigkeit der Körperhülle, Eisenoxydhydrat zu speichern, in Zusammenhang. Klebs berichtet, daß *Euglena spirogyra* mit Hämatoxylin färbbar ist. Die Färbung beruht seiner Ansicht nach auf einer Verbindung des Farbstoffes mit dem in der Pellicula eingelagerten Eisenoxydhydrat. An Eugleninen mit eisenfreiem Periplasten konnte er eine solche Färbbarkeit nicht beobachten.

Außer an *Euglena spirogyra* fand ich auch an *Lepocinclis ovum* den Periplasten stark färbbar. Dies fiel besonders auf, da, wie erwähnt, die Körperhülle der starren Eugleninen (*Phacus*, *Lepocinclis*) vital kaum färbbar ist. Mittels der Berlinerblaureaktion ist nun bei *Lepocinclis ovum* in der Pellicula Eisen nachzuweisen<sup>1</sup>. Es dürfte auch hier die Fähigkeit der Körperhülle, Eisensalze zu speichern, und die starke Färbbarkeit des Periplasten auf gleichen Ursachen beruhen. Auffällig war, daß sowohl im Endstachel von *Euglena spirogyra* als auch in der Endspitze von *Lepocinclis ovum* kein Eisen nachweisbar war. An diesen Stellen wurden auch Vitalfarbstoffe nicht gespeichert.

Es wurde bereits angedeutet, daß bei Färbung des Periplasten die Zeit, nach welcher beobachtet wird, von großer Bedeutung ist. Es wird nämlich eine anfangs deutliche Färbung der Körperhülle nach 20–30 Minuten zusehends schwächer und verschwindet bisweilen vollkommen. In besonderem Maße wird diese Entfärbung an Formen deutlich, welche Schleimorganellen besitzen, die nun ihrerseits kräftig gefärbt erscheinen. Solche Vorgänge wurden zumal an *Euglena granulata* und *Euglena geniculata* häufig beobachtet. Euglenen ohne Schleimorganellen (*Euglena viridis*, *Euglena deses*) behalten die Färbung des Periplasten lange Zeit.

Die vorliegenden Beobachtungen deuten auf eine Speicherkonkurrenz hin. Die stärkste Affinität zum Farbstoff haben offensichtlich die mannigfachen Schleimorganellen dieser Flagellaten. Es sei vorausgenommen, daß ich die untere Färbegrenze dieser Gebilde in Neutralrot um pH 4,2 gelegen fand. Es scheint hier ein analoger Fall zur Speicherkonkurrenz der „vollen“, d. h. speicherstoffführenden Zellsäfte höherer Pflanzen vorzuliegen (vgl. Höfler 1948, 1950).

<sup>1</sup> In ähnlicher Weise wie bei *Euglena spirogyra* färben sich dabei die spiraligen Höckerreihen besonders deutlich. Die Blaufärbung der Pellicula ist allgemein etwas heller als bei *Euglena spirogyra*. Die stumpf kegelförmige Endspitze von *Lepocinclis ovum* bleibt bei der Berlinerblaureaktion stets ungefärbt.

### Farbspeicherung im Plasma und in der Hauptvakuole

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargetan, wird durch Neutralrot der Periplast im Bereich von pH 5 bis pH 6,5 gefärbt. Ab pH 7 unterbleibt diese Färbung, der Farbstoff wird im Zellinneren der Euglenen gespeichert. Die Art und Weise dieses Vorganges soll nun an einer Anzahl von Euglenaceen näher untersucht werden.

Ich beschreibe zunächst an Hand eines Versuchsprotokolles einen Grundversuch an *Euglena viridis*. Gefärbt wurde mit Neutralrot 1:10.000, in Wiener Leitungswasser gelöst (pH um 7,8).

19. November 1952.

- 8.30 Uhr: Vom Lichtrande des Sammelgefäßes entnommene Euglenen in das Farbbad eingebracht.
- 8.31 Uhr: Die eben noch lebhaft schwärmenden Zellen kriechen ruckweise vorwärts; lebhaft Metabolie. Die Geißeln sind meist erhalten geblieben.
- 8.35 Uhr: Erstes Auftreten von Farbstoffaggregaten in der Zelle. Am Vorderende, rund um die Hauptvakuole werden kleine rote Tröpfchen sichtbar. Hinterende zart diffus rosa gefärbt. Die Neutralrottröpfchen werden allmählich größer und deutlicher. Die vorerst diffuse Rosafärbung des Hinterendes löst sich in eine feine Tröpfchenspeicherung auf. Die Hauptvakuolen sind meist stärker konturiert und deutlich angeschwollen. Lebhaft Metabolie.
- 8.40 Uhr: Farbstofftröpfchen in der ganzen Zelle; am Vorder- und Hinterende sowie in der Gegend des zentral gelegenen Paramylonbildungsherdes besonders zahlreich.
- 8.45 Uhr: Reichliche Tröpfchenspeicherung im Plasma. Die Tröpfchen finden sich in den chloroplastenfreien Plasmapartien zusammengedrängt. Hauptvakuolen meist wieder normal.
- 8.50 Uhr: Die Farbstofftröpfchen sind noch größer geworden. Neben wenigen, besonders großen Neutralrotkugeln sind zahlreiche kleine im Plasma verteilt. Hauptvakuolen allgemein wieder normal, bisweilen rosa gefärbt (Abb. 1).
- 9 Uhr: Präparat in feuchte Kammer gestellt.

20. November 1952.

- 8 Uhr: Zellen meist schwärmend, das Zellinnere dicht mit braunroten, großen und kleinen Farbstofftröpfchen gefüllt. Hauptvakuolen normal und ungefärbt.

Die Präparate wurden noch zwei Tage hindurch über Nacht in feuchter Kammer gehalten und am folgenden Tag durchgesehen. Außer einer steigenden Rate toter Zellen hatte sich nichts geändert.

Weiterhin wurden meine Versuche auf eine größere Anzahl von Euglenaceen ausgedehnt, um größeres Vergleichsmaterial zu gewinnen. Beim folgenden Versuch mit *Euglena geniculata* empfahl es sich, wegen der stark alkalischen Reaktion des Standortswassers das Farbbad zu puffern.

*Euglena geniculata* (Neutralrot 1:10.000, pH 8):

Nach 5 Minuten treten am Vorderende Farbstofftröpfchen auf. Nach 10 Minuten sind die Neutralrottröpfchen bedeutend größer geworden. Sie sind nun in der ganzen Zelle verteilt. Wenige Zellen schwärmend; meist träge Metabolie. Nach einer Stunde sind die Zellen mit zahlreichen, unter sich ungleich großen Farbstoff-

tröpfchen, welche im Plasma liegen, erfüllt. Die vorhin etwas vergrößerten Hauptvakuolen sind wieder normal geworden und meist ungefärbt. Die Zellen bewegen sich kriechend vorwärts, wobei sie in typischer Weise tropfenförmige Gestalt annehmen.

*Euglena halophila*<sup>2</sup> speichert Neutralrot ebenfalls im Plasma in Form kleiner Tröpfchen. Die ersten Farbstoffaggregate treten nach 5 Minuten auf. Nach 30 Minuten sind die Tröpfchen wohl zahlreicher geworden, doch bleiben sie auch nach einstündiger Färbedauer kleiner als die bei *Euglena*

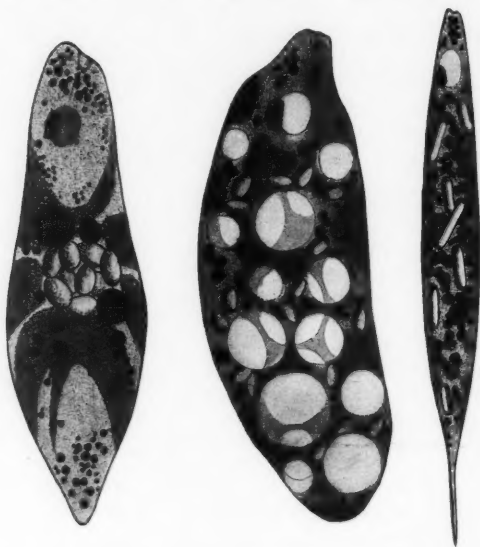


Abb. 1. *Euglena viridis*, 30 Minuten in Neutralrot (1 : 10.000, pH 7,8) gefärbt. Zahlreiche kleine und wenige große Neutralrottropfen im Plasma. Hauptvakuole schwach rot gefärbt.

Abb. 2. *Euglena halophila*. Vakuolierte Zelle mit Neutralrot (1 : 10.000, pH 7,8) gefärbt. Die Farbstofftröpfchen sind in die Plasmastränge zwischen den einzelnen Vakuolen zusammengedrängt; die Vakuolen selbst ungefärbt.

Abb. 3. *Euglena acus*. Neutralrot (1 : 10.000, pH 7,8) gefärbt. Tröpfchenspeicherung im Plasma.

*viridis*. Die Lage der Farbstofftröpfchen im Plasma wird dadurch besonders deutlich, da bei dieser Art in hypotonischen Medien nach ungefähr einer halben Stunde eine Vakuolisierung des Plasmas auftritt (Diskus 1953). Die Farbstofftröpfchen werden durch die sich ausdehnenden Vakuolen in die Plasmastränge zwischen den einzelnen Vakuolen zu-

<sup>2</sup> *Euglena halophila* (von Podersdorf im Salzlachengebiet am Neusiedlersee) wurde von Schiller als neue Art beschrieben. Abbildungen normaler und im Hypotonikum vakuolisierter Zellen bei Diskus (1953), Tafel 1 u. 2.

sammengedrängt (Abb. 2). Die Vakuolen selbst bleiben stets ungefärbt. Ähnliches konnte ich auch an *Phacus orbicularis* beobachten.

Außer bei den eben beschriebenen Arten fand ich eine ähnliche Tröpfchenspeicherung von Neutralrot im basischen Bereich bei *Euglena gracilis*, *E. acus* (Abb. 3), *E. proxima*, *E. deses*, *E. sp.* (RMK<sup>a</sup>) und *E. granulata*.

Etwas unterschiedlich verhielten sich *Euglena spirogyra*, *E. caudata* und *E. tripteris*. In Neutralrot (1 : 10.000, pH 8) war vorerst keine Farbspeicherung zu beobachten. Erst nach 30 Minuten traten winzige Neutralrottröpfchen im Plasma auf. Nach fünf Stunden war im Zellinneren von *Euglena spirogyra* eine langgestreckte Ansammlung von dichtgelagerten Farbstofftröpfchen zu sehen. Wenige lagen vereinzelt am Vorder- und Hinterende. Das Färbbild an *Euglena caudata* und *E. tripteris* blieb ungefähr gleich. Die Tröpfchenspeicherung war nur gering und die Farbstoffaggregate unregelmäßig in der Zelle verteilt.

Ähnlich verhalten sich die untersuchten *Phacus*- und *Lepocinclis*-Arten. Der Färbvorgang sei an Hand eines Versuchsprotokolles kurz geschildert:

17 Uhr: Neutralrot 1 : 10.000, pH 8 dem Präparat zugesetzt.

17. April 1953.

17.30 Uhr: Zarte Tröpfchenspeicherung im Plasma von *Phacus longicauda*, *Ph. pleuronectes*, *Ph. triqueter* und *Ph. alata*. An *Phacus pyrum* und *Lepocinclis Steinii* sind nur wenige, relativ große Neutralrotkugeln in der Zelle vorhanden. Spärliche Tröpfchenspeicherung bei *Lepocinclis texta* und *L. ovum*.

17.50 Uhr: Präparate in feuchte Kammer gestellt.

18. April 1953.

8 Uhr: *Phacus longicauda* (Abb. 4), *Ph. pleuronectes*, *Ph. triqueter* und *Ph. alata* mit zahlreichen kleinen Tröpfchen im Plasma. Sie sind in der Umgebung des Kernes meist dicht gedrängt zu finden. *Lepocinclis texta* und *L. ovum* zeigen eine Anhäufung von Neutralrotkugeln im zentralen Teil der Zelle. An *Phacus pyrum* sind in der Nähe der beiden randständigen Paramylonringe große Farbstoffkugeln zu beobachten (Abb. 5). Alle Zellen beweglich.

8.30 Uhr: Präparate in feuchte Kammer gestellt.

20. April 1953.

9 Uhr: An den Färbbildern hat sich wenig geändert. Viele Zellen sind tot und diffus rosa gefärbt.

Sehr reichliche Tröpfchenspeicherung fand ich einmal an *Phacus pleuronectes*. Die Zellen hatten nach zwanzigstündigem Aufenthalt in der Neutralrotlösung zahlreiche, in der Gegend des Kernes besonders dicht gelagerte Farbstofftröpfchen in sich.

Gleiche Versuche wurden an einigen Euglenen auch mit Neutralviolett angestellt. Der Farbstoff steht chemisch dem Neutralrot nahe und färbt in ähnlicher Weise, wenn auch etwas rascher und intensiver. Besonders die Hauptvakuolen färben sich damit deutlich an.

<sup>a</sup> RMK: Bezeichnung für ein in der Ramsau bei Schladming in 1200 m Höhe gelegenes Hochmoor. In Algenproben aus diesem Moor fand sich in Mengen eine nicht näher bestimmte, spindelförmige, lebhaft metabolische Euglena.

In größerem Umfang wurde mit Rhodamin B gearbeitet. Ich schildere kurz den Färbevorgang an *Euglena viridis* (Rhodamin B, 1 : 1000, in Wiener Leitungswasser gelöst):

9.05 Uhr: Schwärmende Zellen in die Farblösung eingebracht.

9.06 Uhr: Zellen kontrahieren sich oder kriechen langsam dahin; wenige schwärmen.

9.30 Uhr: Alle Zellen schwärmend; keine Färbung.

9.50 Uhr: Zartrosa Plasmafärbung, besonders deutlich im chloroplastenfreien Raum am Vorder- und Hinterende zu beobachten. Einzelne chlorotische Zellen diffus rosa gefärbt; spärliche Tröpfchenspeicherung. Hauptvakuole vereinzelt rosa gefärbt. Allgemein deutliche Kontraktion der Chloroplasten. Alle Zellen schwärmen.

17 Uhr: Rosa Plasmafärbung, spärliche Krümelspeicherung. Etwa 10% tote Zellen; deren Plasma ist stark rot gefärbt.

*Euglena geniculata* speichert den Farbstoff nach 10 Minuten in Tröpfchenform im Plasma. Die Tröpfchen bleiben klein und sind stets nur spärlich vorhanden. Nach 50 Minuten tritt eine diffuse rosa Plasmafärbung auf. Sie ist lediglich im chloroplastenfreien Teil der Zelle deutlich zu sehen. Nach 24 Stunden ist das Färbbild im wesentlichen gleich geblieben: Geringe Tröpfchenspeicherung und rosa Plasmafärbung.

Bei den meisten untersuchten Euglenen tritt nach Färbung mit Rhodamin B an Stelle der Tröpfchenspeicherung eine besonders an ganz oder teilweise chlorotischen Zellen deutlich sichtbare Plasmafärbung zutage. An *Euglena spirogyra*, *E. acus* und einigen *Phacus*-Arten fiel stets die deutlich rotviolette Färbung der Endspitze auf. Nach längerer Färbedauer erfolgt



Abb. 4. *Phacus longicauda*. Neutralrotfärbung (1 : 10.000, pH 8). Tröpfchenspeicherung im Plasma.

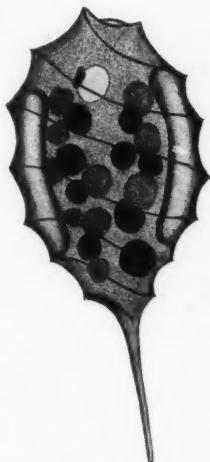


Abb. 5. *Phacus pyrum* (stärker vergrößert). Neutralrotfärbung (1 : 10.000, pH 8). Wenige große Farbstoffkugeln im Plasma beiderseits der Paramylonringe.

allgemein eine Kontraktion der Chloroplasten. Die Hauptvakuole konnte an *Euglena viridis*, *E. geniculata*, *E. granulata* und *E. deses* mit Rhodamin B angefärbt werden.

In ähnlicher Weise wie Neutralrot wurde Bismarckbraun von den Euglenen gespeichert: Färbt man *Euglena viridis* mit Bismarckbraun 1 : 10.000, pH 10, so geben die Zellen vorerst die Schwimmbewegung auf und gehen



in lebhafteste metabolische Bewegungen über. Nach 5 Minuten erscheinen kleinste, hellbraune Tröpfchen im Plasma, nach 15 Minuten sind diese etwas größer geworden und am Vorderende dichter gelagert (Abb. 6). In der Zwischenzeit haben viele Zellen die Schwimmbewegung wieder aufgenommen. Am Färbepunkt ändert sich von nun an nichts mehr. Die Hauptvakuole blieb stets ungefärbt.

Bismarckbraun wird von den verschiedenen Euglenaceen nach verschiedener Zeit und in unterschiedlichem Maße gespeichert. Besonders schnell und reichlich wurde es von *Euglena viridis*, *E. geniculata*, *E. proxima* und *E. gracilis* aufgenommen. Schon nach wenigen Minuten traten die ersten Farbstoffaggregate in der Zelle auf. Langsamer und auch spärlicher treten sie bei *Euglena deses*, *E. halophila* (Abb. 7), *E. sp.* (RMK) und *E. acus* zutage. Sehr langsam geht die Farbspeicherung bei *Euglena spirogyra*, *E. fusca*, *E. tripteris*, *Phacus pyrum*, *Ph. pleuronectes*, *Ph. triqueter*, *Ph. acuminatus*, *Ph. longicauda*, *Ph. alata*, *Lepocinclis texta*, *L. ovum* und *L. Steinii* vor sich. Es vergehen meist 20 bis 30 Minuten, ehe eine Tröpfchenspeicherung sichtbar wird.



Abb. 6.

Abb. 6. *Euglena viridis*. Bismarckbraun (1 : 10.000, pH 10). Reichliche Tröpfchenspeicherung im Plasma.



Abb. 7.

Abb. 7. *Euglena halophila*. Bismarckbraun (1 : 10.000, pH 10). Tröpfchenspeicherung.

Zusammenfassend ist über die bisher besprochenen Farbstoffe folgendes zu sagen: Neutralrot, Neutralviolett und Bismarckbraun werden von der *Euglena*-Zelle hauptsächlich in Form kleiner Tröpfchen im Plasma gespeichert, Rhodamin B färbt dagegen vornehmlich das Plasma diffus rosa an. Die Farbstoffkügelchen im Plasma können bei Färbung mit Neutralrot und Neutralviolett bedeutende Größe erreichen, die Bismarckbrauntröpfchen bleiben dagegen stets klein. Eine Färbung der Hauptvakuole gelingt am ehesten mit Neutralviolett und Neutralrot, weniger gut mit Rhodamin B. Bismarckbraun vermochte die Hauptvakuole nicht anzufärben. Gemeinsam war diesen vier Farbstoffen ihre weitgehende Unschädlichkeit. Der Schock, welcher zur Einstellung der Schwimmbewegung führt, wurde allgemein schon nach kurzer Zeit überwunden. Eine bei den einzelnen Arten ver-

schieden starke Kontraktion der Chloroplasten beeinträchtigte den Lebenszustand der Zellen meist nicht.

Verschieden verhielten sich die Euglenen gegenüber Vitalfärbung mit blauen basischen Farbstoffen. Diese sollen nun gesondert behandelt werden. Zur Verwendung kamen Brillantkresylblau, Toluidinblau, Thionin und Cresylechtviolett. Vorerst sei ein pH-gestuftter Reihenversuch mit Brillantkresylblau wiedergegeben.

*Euglena geniculata*, Brillantkresylblau 1 : 10.000:

- pH 2,5: Schwebbewegung wird sofort eingestellt; lebhaft Metabolie. Keine Färbung.
- pH 3,1: Nach 2 Minuten zart blauviolette Färbung des Periplasten. Zellen meist lebhaft metabolisch, wenige vollkommen ruhig.
- pH 4,5: Blauviolette Färbung des Periplasten.
- pH 5,3: Nach 5 Minuten tritt zu der blauvioletten Periplastfärbung eine zarte, reinblaue Tröpfchenspeicherung am Zellvorderende.
- pH 9: Nach 5 Minuten deutliche reinblaue Tröpfchenspeicherung in der ganzen Zelle; Periplast blauviolett gefärbt.
- pH 11: Tröpfchenspeicherung; Periplast kaum gefärbt.
- pH 12,5: Periplast ungefärbt. Nach 2 Minuten erscheinen im Plasma rund um die Hauptvakuole kleine blaue Farbstofftröpfchen. Sie treten nur spärlich auf.

Wie der Versuch zeigt, kann Brillantkresylblau in einem weiten pH-Bereich gleichzeitig den Periplasten färben als auch in Tröpfchenform im Plasma gespeichert werden. Reihenversuche mit pH-gestuftten Lösungen von Brillantkresylblau, an anderen Euglenaceen ausgeführt, ergaben ähnliche Resultate. In den folgenden Versuchen wurde mit Brillantkresylblau 1 : 10.000, pH 11,5, die Art und Weise der Farbspeicherung bei den einzelnen Euglenaceen untersucht:

*Euglena viridis* speichert wie *Euglena geniculata* den Farbstoff ebenfalls in Form kleinster Tröpfchen im Plasma, besonders am Zellvorderende. In gleicher Weise entstehen Farbstofftröpfchen auch im Plasma von *Euglena deses*, *E. halophila*, *E. acus* und *E. sp.* (RMK). Sie sind stets an den Zellenden, vornehmlich am Vorderende zu finden.

*Phacus longicauda*, *Ph. pleuronectes*, *Ph. triqueter*, *Ph. alata*, *Euglena spirogyra*, *E. tripteris*, *E. oxyuris* speichern Brillantkresylblau aus stark alkalischer Lösung in geringer Menge in Form kleinster Tröpfchen, welche sich meist regellos in der Zelle vorfinden. Unter den *Phacus*-Arten fiel wiederum *Phacus pyrum* durch seine großen Farbstoffkugeln beiderseits der Paramylonringe auf. *Lepocinclis texta* und *L. ovum* färben sich ähnlich wie die meisten *Phacus*-Arten. Die Tröpfchen sind hier lediglich im inneren Teil der Zelle angehäuft, während das periphere Plasma frei von Farbstoffaggregaten ist.

Ein abweichendes Färbverhalten fand ich einmal an *Phacus acuminatus*. Die frischen Proben verhielten sich bei Färbung mit Brillantkresylblau 1 : 10.000 vorerst wie die übrigen Vertreter dieser Gattung. Es entstanden kleine, unregelmäßig im Plasma verteilte Tröpfchen. Das Material wurde nun 14 Tage in einem dunklen Raum kultiviert. Die Zellen hatten nach die-

ser Zeit die grüne Färbung zum Teil oder gänzlich verloren. Im Zellinneren waren zahlreiche Vakuolen zu beobachten, alle Zellen waren am Leben, viele schwammen dem Licht zu, auch die übrigen machten einen gesunden Eindruck. Es war meist reichlich Hämatochrom vorhanden.

Bei Vitalfärbung dieser ganz oder teilweise chlorotischen Zellen mit Brillantkresylblau 1:10.000, pH 12,5, entstanden in den Zellen nach 2 Minuten zahlreiche ringförmige Anhäufungen violetter Farbstofftröpfchen (Abb. 8). In noch chlorophyllführenden Zellteilen traten solche Tröpfchen nicht auf. Der Endstachel war häufig innerhalb der Pelicula diffus blau gefärbt.

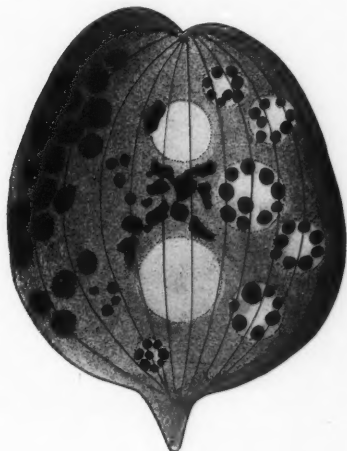


Abb. 8. *Phacus acuminatus*. Teilweise chlorotische Zelle nach Färbung mit Brillantkresylblau 1:10.000, pH 12,5). In den Vakuolen des chloroplastenfreien Zellteiles entstehen zahlreiche violette Farbstofftröpfchen. In der Zellmitte Hämatochrombrocken.



Abb. 9. *Euglena viridis*. Neutralrot (1:10.000, pH 7,8). Zelle in metabolischer Bewegung. Tröpfchenspeicherung im Plasma. Die plasmatische Hülle der Geißel ist zu einem Koagulationstropfen zusammengefloßen. Dieser rotgefärbte Tropfen wird von dem farblos gebliebenen Achsenfaden umwunden.

In ähnlicher Weise wie Brillantkresylblau wird Toluidinblau von der *Euglena*-Zelle aufgenommen. Ein pH-gestufter Reihenversuch ergab an *Euglena halophila* Periplastenfärbung von pH 5 und pH 6. Schon oberhalb pH 6 bleibt eine Färbung des Periplasten meist aus, an ihre Stelle tritt Tröpfchenspeicherung im Plasma. Die Färbepilder bei den einzelnen Arten gleichen ungefähr denen bei Färbung mit Brillantkresylblau. —

Bei längerer Färbedauer werden häufig die Geißeln sonderbar verändert: An zur Ruhe gekommenen Zellen sind an der Geißelspitze ein oder auch zwei große, lebhaft gefärbte Tropfen zu sehen. Um diese ge-

färbten Kugeln herum windet sich ein farbloser Faden (Abb. 9). Ich beobachtete diese Erscheinung verschiedentlich an *Euglena viridis* und *Euglena geniculata* nach Färbung mit Neutralrot, Neutralviolett, Rhodamin B und Brillantkresylblau. Die Färbung ist mit 0,2 Mol  $\text{CaCl}_2$  nicht auswaschbar. Solcherart veränderte Geißeln können noch lebhaft zuckende Bewegungen ausführen. Bei den gefärbten Tropfen dürfte es sich um Geißelplasma handeln, welches bei Schädigung der Geißel an der Spitze zusammenfließt, während der plasmatische Achsenfaden diese Kugeln umwindet (vgl. Günther 1927, Mainx 1927, S. 310).

Mit Thionin wurden einzelne Arten vergleichend gefärbt. Auch hier trat Tröpfchenspeicherung in gewohnter Weise auf. Es entstehen meist nur wenige, kleine, unter sich ungefähr gleich große Kügelchen. Sie sind bei den Euglenen am Vorderende zahlreicher als in den hinteren Zellregionen. Bei den *Phacus*-Arten sind Farbstoffaggregate in der ganzen Zelle unregelmäßig verteilt.

Das von Stiegler in die Färbetechnik eingeführte Cresylechtviolett wurde wegen seiner deutlich schädigenden Wirkung zur Vitalfärbung wenig verwendet. Es bildet im Plasma wenige, violettblaue Tröpfchen. Auffallend war das besonders starke Anschwellen der Hauptvakuole bei allen untersuchten Euglenaceen, nachdem sie in eine Lösung von Cresylechtviolett 1:10.000 eingebracht wurden. —

Zusammenfassend ist über die angeführten blauen basischen Vitalfarbstoffe zu sagen: Der Periplast färbt sich mit diesen Farbstoffen stets elektroadsorptiv metachromatisch. Im Plasma werden sie in Tröpfchenform in verschieden starkem Ausmaß gespeichert, doch allgemein bedeutend schwächer als etwa Neutralrot oder Neutralviolett. Die Tröpfchen treten vor allem am Vorderende auf; sie werden bei längerer Färbedauer weder zahlreicher noch größer. Eine Färbung der Hauptvakuole konnte ich bei meinen untersuchten Arten mit Brillantkresylblau selten, mit den übrigen blauen Farbstoffen nie erreichen. Alle verwendeten basischen Farbstoffe bewirkten nach einiger Zeit ein Anschwellen der Hauptvakuole. Diese Veränderung des Reservoirs geht nach ungefähr 20 Minuten wieder zurück. Eine Kontraktion der Chloroplasten trat auch bei Vitalfärbung mit den blauen basischen Farbstoffen stets ein.

### Zusammenfassung und Besprechung

In der vorliegenden Arbeit wurde über Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen an Eugleninen berichtet. Unter Anwendung pH-gestufter Farbbadreihen konnte eine prinzipielle Übereinstimmung im Färbeverhalten von toten Zellwänden und der Körperhülle der Eugleninen gefunden werden: Der Periplast ist in ähnlicher Weise wie die Membranen aller übrigen Pflanzen durch Farbkationen färbbar. In das Zellinnere der Euglenen können nur Farbmoleküle eindringen. Wichtig erscheint es, daß ein isoelektrischer Punkt, d. h. eine Umladung der Substanz des Periplasten erreicht werden kann, während dies bei den Zellulosemembranen der höheren Pflanzen in der Regel nicht möglich ist. Diese besitzen lediglich

einen Entladungspunkt (EP), unterhalb dessen weder basische noch saure Farbstoffe aufgenommen werden. Die Färbung des Periplasten ist stets eine elektroadsorptive, wie durch die Entfärbbarkeit mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen gezeigt wurde. Auch die metachromatischen Färbungen dieser Zellorganelle bei Verwendung blauer basischer Farbstoffe deuten darauf hin. Am Periplasten wurde auf vitalem Wege ein isoelektrischer Punkt (IEP) ermittelt, welcher um pH 5 (5,1—5,5) gelegen ist, bei *Euglena spirogyra* dagegen bedeutend niedriger liegt. Bei dieser Art entspricht der niedrige IEP wahrscheinlich der Fähigkeit des Periplasten, Eisenoxydhydrat zu speichern. Die schon von Klebs gefundene Tatsache, wonach die Körperhülle der metabolischen Euglenen mit basischen Farbstoffen meist färbbar, die der starren Eugleninen nicht färbbar ist, konnte mittels moderner Färbemethoden bestätigt werden. Im Falle der starken Färbbarkeit der Körperhülle von *Lepocinclis ovum*, einer starren Euglenine, ist ein Zusammenhang zwischen Färbbarkeit des Periplasten und dessen Fähigkeit zur Eisenspeicherung anzunehmen.

Aus molekularen, permeierfähigen Farbstofflösungen werden die Farbstoffe von den Eugleninen meist in Tröpfchenform im Plasma gespeichert. Die Hauptvakuole ist allgemein nur schwach färbbar; das erklärt sich wohl dadurch, daß sie von Zeit zu Zeit entleert wird, eine Farbspeicherung in größerem Maße daher nicht möglich ist.

Eine allgemeine Erscheinung ist das leichte Anschwellen der Hauptvakuole in der Farblösung<sup>4</sup>. Rein äußerlich gleicht der Vorgang der schon mehrfach beschriebenen Vergrößerung des Reservoirs in hypertonen Lösungen (Klebs 1885, K. u. L. Höfler 1952, Hilmbauer 1954). Damit hat das leichte Anschwellen der Hauptvakuole in den Farblösungen jedoch nichts gemein. Der Effekt ist in diesem Falle kein osmotischer, sondern er beruht offenbar auf einer Reizwirkung des Farbstoffes. Nach Hamburger (1911) hätte der von ihr beschriebene „Sphinkter“ um den Schlundtrichter die Funktion, durch Kontraktion den Schlundkanal zu schließen, um das Eindringen schädlicher Stoffe in das Zellinnere (Vakuole) zu verhindern. Nimmt man an, daß die Nebenvakuolen noch Flüssigkeit in das Reservoir ergießen, dieses aber durch Kontraktion des Sphinkters von der Außenwelt abgeschlossen ist, so ist das Anschwellen der Hauptvakuole damit erklärt. Prinzipiell gleich hat Klebs das Anschwellen der Hauptvakuole in hypertonen Lösungen gedeutet. Demnach wäre die Hauptvakuole im Hypertonikum unfähig, sich zu entleeren, während die Nebenvakuolen noch einige Zeit Flüssigkeit in das Reservoir ergießen und dieses dadurch anschwillt. Für den Fall des Anschwellens des Reservoirs im Hypertonikum ist die von Klebs gegebene Erklärung nicht völlig befriedigend (s. K. und L. Höfler 1952, S. 99). Die Vergrößerung der Hauptvakuole in Farbstofflösungen ist dagegen auf diese Weise wohl am ehesten zu verstehen.

<sup>4</sup> Nach Günther (1927) ist die Hauptvakuole der Euglenen Giftstoffen gegenüber besonders empfindlich. Bei Behandlung der Zellen mit solchen Stoffen beobachtete er je nach dem Pulsationsstadium ein Aufblähen oder ein Zusammenschnüren der Hauptvakuole.

Es sei gestattet, dem Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Karl Höfler, für die Anregung zu dieser Arbeit und die stete Hilfe und Unterstützung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

#### Literatur

- Bolte, E., 1920: Über die Wirkung von Licht und Kohlensäure auf die Beweglichkeit grüner und farbloser Schwärmerzellen. Jb. wiss. Bot. 59, 287.
- Carter, H. J., 1856: On fecundation in the two Volvoces and their specific differences on *Eudorina*, *Spongilla*, *Astasia*, *Euglena* and *Cryptoglena*. Quart. J. microsc. Sci., Vol. II.
- Czaja, A. Th., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. II. Basische Farbstoffe. Planta 21, 531.
- Dangeard, A. P., 1902: Recherches sur les Eugléniens. Le Botaniste 8, 7.
- Dangeard, P., 1924: Le vacuome chez les Eugléniens. Bull. Soc. Bot. France 71, 297.
- Diskus, A., 1955: Zum Osmoseverhalten halophiler Euglenen vom Neusiedler See. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. 1, 150, 171.
- Drawert, H., 1937: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta 29, 179.
- 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Flora 132, 91.
- 1948: Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturf. 3 b, 111.
- 1949: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen. II. Ebenda 4 b, 35.
- 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma 40, 85.
- Ehrenberg, 1831, 1835: Beiträge zur Erkenntnis der Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. Abh. Berliner Akad. Wiss.
- Fritsch, F. E., 1948: The Structure and Reproduction of the Algae. I, 724—741. Cambridge.
- Günther, F., 1927: Über den Bau und die Lebensweise der Euglenen. Arch. Protistenk. 60, 511.
- Hamburger, C., 1911: Studien über *Euglena Ehrenbergii*, insbesondere über die Körperhülle. Sitzungsber. Heidelberger Akad. Wiss. 4, 1.
- Hilmbauer, K., 1954: Zellphysiologische Studien an Euglenaceen, besonders an *Trachelomonas*. Protoplasma 43, 192.
- Höfler, K., 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungsber. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 585.
- u. L., 1952: Osmoseverhalten und Nekroseformen von *Euglena*. Protoplasma 41, 76.
- und E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Öst. Bot. Z. 49, 99.
- und H. Schindler, 1952: Algengallerten im Vitalfärberversuch. Öst. Bot. Z. 99, 529.
- und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie 2, 250.
- Jennings, I., 1910: Das Verhalten der niederen Organismen. Jena.



- Kinzel, H., 1952: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Ost. Bot. Z. 100, 25.
- 1953: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma 42, 209.
- Klebs, G., 1885: Über die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. Unters. Bot. Inst. Tübingen 1, 235.
- 1885: Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Ebenda 2, 255.
- 1893: Flagellatenstudien I und II. Z. wiss. Zool. 55, 265 und 355.
- Mainx, F., 1927: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglenen I und II. Arch. Protistenk. 60, 305.
- Oltmanns, F., 1917: Über Phototaxis. Z. Bot. 9, 257.
- Pischinger, A., 1926: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. Zellforsch. 3, 169.
- Pochmann, A., 1953: Struktur, Wachstum und Teilung der Körperhülle bei den *Eugleninen*. Planta 42, 478.
- Pringsheim, E. G., 1912: Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Beitr. Biol. Pflanzen. 12, 1.
- Stein, F., 1878: Der Organismus der Flagellaten. Leipzig.
- Stiegler, A., 1950: Vitalfärbung an Pflanzenzellen mit Cresylechtviolett. Protoplasma 39, 495.
- Strucker, S., 1940: Neues über Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 44, 601.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Ternetz, Ch., 1912: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis*. Jb. wiss. Bot. 51, 435.
- Wager, H., 1900: On the eye-spot and flagellum in *Euglena viridis*. The Journal of the Linnean Society, London, Vol. 21, 463.
- Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma 40, 405.
- Yamaha, G., 1955: Weitere Beiträge zur Kenntnis über den isoelektrischen Punkt pflanzlicher Protoplasten. Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, sec. B, 209.
- Zumstein, H., 1900: Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis*. Jb. wiss. Bot. 34, 149.

# Der Einfluß der Ascorbinsäure auf die Assimilation und Atmung höherer Pflanzen

Von

**Herbert Luger**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität München

(Die Versuchsprotokolle können vom Verfasser angefordert werden)

Mit 23 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. April 1954)

## Einleitung

Die Ascorbinsäure ist ein Stoff, den wir in allen autotrophen höheren Pflanzen vorfinden. Bei den Heterotrophen kann sie fehlen. Es liegt deshalb die Vermutung sehr nahe, daß sie mit den Lebensvorgängen der grünen Pflanze in engstem Zusammenhang steht.

Betrachtet man das Ascorbinsäuremolekül vom Standpunkt des Chemikers aus, so kann man es als kohlehydratähnlichen Alkohol und als En-di-ol mit zwei leicht abspaltbaren, aciden Wasserstoffatomen charakterisieren. Damit sind aber die chemischen Eigenschaften dieses interessanten Stoffes noch nicht hinreichend gekennzeichnet. Die Ascorbinsäure vermag vielmehr noch eine Reihe von Verbindungen einzugehen, die insbesondere für ihre physiologische Wirksamkeit von größter Bedeutung sein können. Dazu gehört vor allem die Bindungsmöglichkeit an Eiweiß (Ascorbinogen) (vgl. Holtz und Reichel 1940). Neuere russische Arbeiten (Goldstein und Volkenson 1947) berichten von einer Bindung der Ascorbinsäure an Nukleinsäure über leicht abspaltbares Eisen. Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Bindung Ascorbinsäure-Chlorophyll. Schon Rakshit (1938) hat eine derartige Verbindung angenommen. Nach Krassnowski und Brin (1930) besitzt dieses System eine große Bedeutung als lichtabhängiger Redoxkörper.

Über die Lokalisation der Ascorbinsäure im Pflanzenkörper war man sich lange nicht einig. Manche Forscher führten die sogenannte Molisch-Reaktion (Silberreduktion in den Chloroplasten) auf die Reduktionskraft des Vitamin C zurück (Weber 1937). Bukatsch (1939/40) konnte nachweisen, daß der Extrakt aus durch Zentrifugieren abgetrennten, gewaschenen Chloroplasten Ascorbinsäure enthält. Andere Forscher (z. B. Miri-

manoff 1938) führten die Molisch-Reaktion auf andere Stoffe zurück. Neuerdings ist nun durch die Arbeiten von Metzner (1952) einwandfrei erwiesen, daß die Silberreduktion nur durch das Vorhandensein von Ascorbinsäure in den Chloroplasten zu erklären ist. Das erscheint jetzt um so wichtiger, als von Arnon (1948) in den Chloroplasten von *Beta vulgaris* eine kupferhaltige Polyphenoloxydase entdeckt wurde, welche befähigt ist, Ascorbinsäure zu oxydieren. Somit erscheint die Möglichkeit einer reversiblen Redoxfunktion der Ascorbinsäure in den Chloroplasten gegeben.

Auf Grund vieler Beobachtungen war auch die Vermutung eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen Chlorophyllgehalt und Vitamin-C-Gehalt in den Assimilationsgeweben der Pflanzen sehr naheliegend. Am auffälligsten war die Ascorbinsäure-Chlorophyll-Relation beim Vergleich der Vitamin-C-Gehalte normalgrüner Blätter mit den Vitamin-C-Gehalten etiolierter Blätter zu beobachten (Giroud 1938). Bukatsch berichtet 1943 und 1952 über einen höheren Vitamin-C-Gehalt der Sonnenblätter gegenüber dem von Schattenblättern mehrerer Arten. Die Befunde wurden von seiner Schülerin Moser (1950) bestätigt.

Zusammenhänge zwischen Ascorbinsäuregehalt und Atmung waren ebenfalls schon des öfteren Gegenstand von Untersuchungen. Besonders Medawara (1950) hat eine Proportionalität zwischen Ascorbinsäuregehalt und Atmung vermutet. Bukatsch (1952) hat an verschiedenen Objekten gemessen, daß höherer Ascorbinsäuregehalt mit erhöhter Atmung verbunden war. Franke (1952) hat eine Beeinflussung der Atmung von Keimlingen durch Ascorbinsäurezufuhr beobachtet.

Auch eine Wirkung der Ascorbinsäure auf das Pflanzenwachstum ist mehrfach beschrieben worden. So hat Onüratschek (1940 und 1942) ein vermehrtes Wachstum autotropher Algen bei Zugabe von Vitamin C zur Nährlösung beobachten können. Weil die zugesetzten Vitaminmengen viel zu gering waren, um als Baustoff verwertet werden zu können, ist anzunehmen, daß diese Wirkung auf eine gesteigerte Assimilationstätigkeit zurückgeht. In eingehenden Versuchsreihen hat v. Hausen (1936) beobachtet, daß bei Zusatz von Ascorbinsäure zu Wasserkulturen sowohl Längenwachstum als auch Trockengewicht erhöht waren.

Auf Grund all dieser Befunde kann man folgern, daß die Ascorbinsäure ein physiologisch sehr bedeutsamer Pflanzenstoff ist. Schon der Entdecker der Ascorbinsäure, Szentgyörgyi (1925), hat darauf hingewiesen, daß die leicht verschiebbaren Wasserstoffatome der Verbindung wohl in erster Linie die vitaminartigen Wirkungen dieses Stoffes im heterotrophen Organismus hervorrufen. Sicherlich wird dieser Eigenschaft auch im Lebensgeschehen der grünen Pflanze eine maßgebende Bedeutung zukommen.

Die vorliegende Arbeit nahm ihren Ausgang von Untersuchungen, welche die quantitativen Beziehungen zwischen Blattpigmentgehalt und Vitamin-C-Gehalt bei verschiedener mineralischer Ernährung zum Gegenstand hatten. Über diese Arbeit wurde an anderer Stelle (Bukatsch 1951) berichtet. Als interessantes Ergebnis dieser Untersuchungen sei hier nur erwähnt, daß bei allen Versuchspflanzen die Kalimangelkulturen und die Phosphormangelkulturen sowohl einen gesteigerten Chlorophyllgehalt

als auch einen erhöhten Vitamin-C-Gehalt zeigten. Ähnliche Ergebnisse wurden von Watson und Noggle (1947) erhalten.

Da schon früher beobachtet wurde (Gassner und Goetze 1934), daß Kalimangel eine Steigerung der Assimilationsintensität bei höheren Pflanzen hervorruft, tauchte die Frage auf, ob der Ascorbinsäuregehalt einer Pflanze mit ihrer Assimilationsintensität im Zusammenhang steht.

Für die experimentelle Behandlung dieser Frage wurde aber nicht der Versuch mit Mangelpflanzen angestellt, sondern ein anderer Weg beschritten.

## Vergleichende Assimilationsmessungen

### 1. Methode

Bukatsch hat 1952 gefunden, daß man bei Seerosenblättern eine beträchtliche Erhöhung des Vitamin-C-Gehaltes erzielen kann, wenn man diese Blätter einfach auf einer „Cebion“-Lösung schwimmen läßt. Wahrscheinlich erfolgt neben der Aufnahme durch den Stengel auch eine Aufnahme durch die Hydropoten (Grüss 1927). Lösungen, die 1 Gramm pro Liter reine Ascorbinsäure enthielten, erwiesen sich bei den Versuchen als geeignet für die „Fütterung“ der Blätter. Bei späteren Versuchen stellte sich heraus, daß nicht nur bei Schwimmblättern eine derartige Vitamin-C-Anreicherung erzielt werden kann, sondern daß sich auch bei Landpflanzen der Ascorbinsäuregehalt deutlich durch Fütterung, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie bei den Seerosenschwimmblättern, erhöhen läßt. Dazu wurden die Blätter mit dem Stengel unter Wasser abgeschnitten und in Ascorbinsäurelösungen gestellt. Unter geeigneten Bedingungen (hell, geringe relative Feuchtigkeit) erfolgte eine deutlich erkennbare Aufnahme von Ascorbinsäure. Diese Aufnahme erfolgte mit Sicherheit durch den Transpirationsstrom; die aufgenommenen Mengen waren bei geringerer relativer Feuchtigkeit größer als bei hohem Wasserdampfgehalt der Luft. Auch vom Licht erwies sich die aufgenommene Menge abhängig (Spaltöffnungsweite).

Auf diese Weise konnte man also Blätter mit ungewöhnlich hohem Ascorbinsäuregehalt bekommen. Es sollten nun die Assimilationsgrößen dieser Blätter verglichen werden mit denen von Blättern in normalem Zustand.

Zur Assimilationsmessung diente eine Versuchsanordnung, welche zum Teil von Bukatsch (1952) für Atmungsmessungen verwendet worden war (Abb. 1).

Durch zwei „Aerator“-Membranpumpen ( $M_1$  und  $M_2$ ) wurden zwei Luftströme erzeugt. Die sehr konstant arbeitenden Pumpen wurden mit Hilfe zweier Kapillarströmungsmesser ( $R_1$  und  $R_2$ ) in ihrer Tätigkeit dauernd überwacht; falls sich eine Veränderung der Pumpleistung zeigte, wurde diese sofort korrigiert. Damit war also gewährleistet, daß die beiden Luftströmungen stets gleich stark waren, was für die richtige Durchführung der Vergleichsversuche unumgänglich notwendig war.

Der eine Luftstrom wurde dann über das zu untersuchende Blatt geleitet. Zu diesem Zweck befand sich dieses Blatt in einer runden Blechküvette von ca. 15 cm Durchmesser. Die Küvette wurde von oben her durch eine luftdicht abschließende Glasplatte hindurch von einer 500 Watt starken „Osram-Vitalux“-Lampe mit Reflektor beleuchtet. Wenn die Beleuchtungsstärke bei den Versuchen nicht eigens angegeben ist, betrug sie 50.000 Lux.

Zur Aufrechterhaltung der Temperatur wurde die Küvette in ein Glasaquarium gestellt und ununterbrochen von einem Wasserstrom gekühlt. Auf diese Weise war es möglich, die Temperatur in der Küvette bei  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  konstant zu halten.

Nach dem Passieren der Küvette wurde der Luftstrom über die Pumpe ebenso wie der Kontrollluftstrom in eine Absorptionsröhre geleitet. Dort befand sich eine genau abgemessene Menge  $1/22$  n-Barytlauge, mit einer Spur Butanol versetzt. Der Butanolzusatz diente der verbesserten Verteilung des Gasstromes in der Flüssigkeit.

Die Kölbehen, in welche die Barytlauge nach der Absorption abgelassen wurde, waren vorher durch einen  $\text{CO}_2$ -freien Luftstrom (Durchblasen durch einen Natronkalkturm) kohlenstofffrei gemacht. Unter Ausschluß von Luftkohlenstoff wurde dann die Barytlauge mit  $1/44$  n-Oxalsäure rücktitriert. Als Indikator diente dabei Phenolphthalein. Aus der Differenz, die sich aus der Titration der beiden Barytlaugemengen ergab, wurde die Höhe des vom Versuchsblatt aufgenommenen Kohlenstoffbetrages ermittelt.

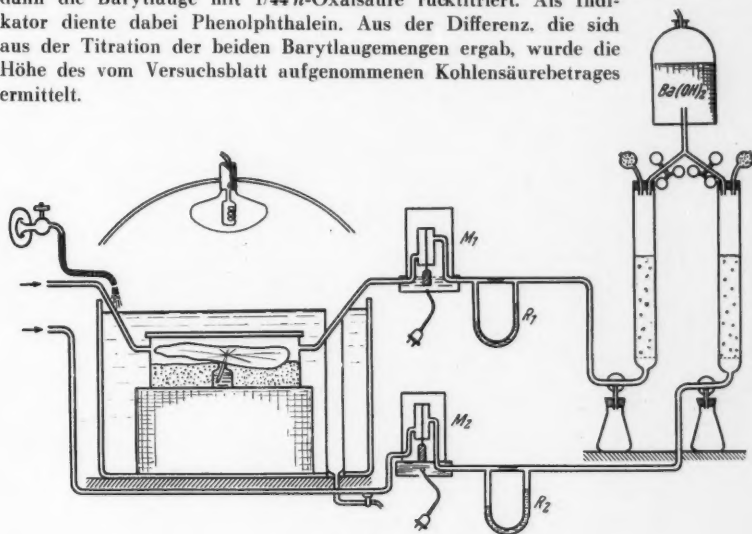


Abb. 1.

Bei zehn Parallelversuchen an gleichem Material ergab sich bei dieser Methode eine mittlere Fehlerbreite von 8,5%.

Bei dieser Arbeitsweise konnte aber ein Blatt immer nur entweder für Atmungs- oder Assimilationsmessung verwendet werden. Da aber sorgfältig auf gleiche Vorbehandlung geachtet wurde und die Blätter stets von der gleichen Pflanze stammten, wurde diese Fehlerquelle auf ein Minimum reduziert.

Zur Bestimmung der Ascorbinsäure wurden die Blätter mit eisenfreiem Quarzsand in 20%iger Metaphosphorsäure zerrieben. Nach zehnfacher Verdünnung mit destilliertem Wasser erfolgte die Titration eines aliquoten Teiles der Lösung mit ziemlich konzentrierter (0,1 g in  $50 \text{ cm}^3$  Wasser) 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung. Die Titration erfolgte aus einer Mikrobürette so lange, bis keine rasche Entfärbung mehr eintrat.

Zur Bestimmung der Dehydroascorbinsäure diente eine vorhergehende Reduktion des Pflanzenauszuges mit Schwefelwasserstoff, nach Vertreibung des Schwefel-

wasserstoffs durch einen Kohlensäurestrom wurde der Extrakt titriert. Die Differenz der Titrationen vor und nach der Reduktion ergab den Gehalt an Dehydroaskorbinsäure.

Als Bezugsgröße für die Assimilationswerte wurde das Frischgewicht gewählt.

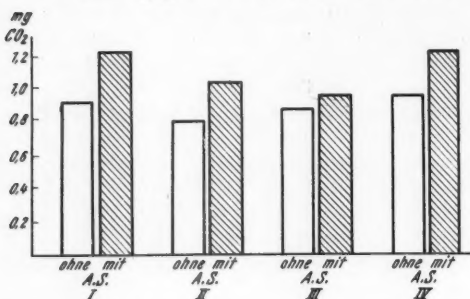


Abb. 2.

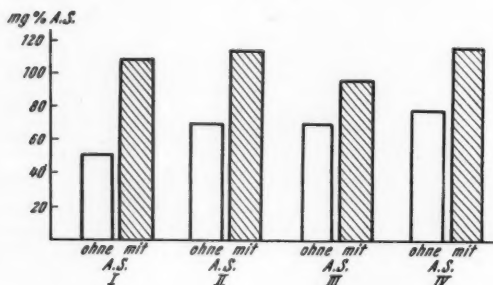


Abb. 3.

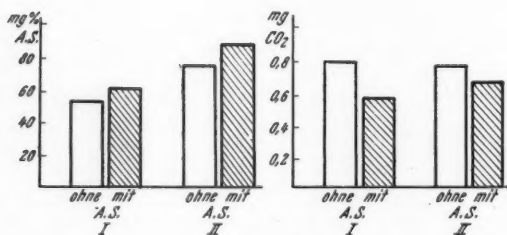


Abb. 4.

Apparente Assimilation verschiedener *Nymphaea*-Arten mit und ohne Ascorbinsäurefütterung.

Behandlungszeit mit A.S.: 6 Std.

Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/g Blatt.

Assimilationsdauer: 10 Min.

I: *Nymphaea Sansiveriensis*; II: *Nymphaea lotus*; III: *Nymphaea stellata*;

IV: *Nymphaea mexicana*.

Diese Bezugsgröße scheint sich auch für den Vergleich der Assimilationsgrößen verschiedener Arten besser zu eignen, da die Dicke des Blattes mit berücksichtigt wird, was beim Bezug auf die Fläche nicht zutrifft.

Die Pflanzen, die für die Versuche verwendet wurden, stammten aus dem Gewächshaus oder dem Freiland des Botanischen Gartens in München.

## 2. Versuchsergebnisse

### A. Orientierende Versuche über den Einfluß von Ascorbinsäureanreicherung auf die Assimilation von Blättern verschiedener Gewächshaus-Nymphaeen

Blätter von verschiedenen Seerosenarten wurden unter Wasser abgeschnitten und teilweise auf destilliertem Wasser (Kontrollblatt), teilweise auf Ascorbinsäurelösungen (1:1000) (A. S.-Blatt) schwimmen gelassen. Das Ergebnis der anschließenden Assimilationsversuchsreihe ist aus der nachfolgenden Darstellung (Abb. 2) ersichtlich.



Während dieser Versuche hatten die Blätter folgenden Ascorbinsäuregehalt (siehe Abb. 3):

Ein grundlegend anderes Bild ergab sich bei einer Ascorbinsäureeinwirkungszeit von 48 Stunden (siehe Abb. 4):

Ascorbinsäuregehalt.

App. Assimilation

Behandlungszeit mit A.S.: 48 Std.

mg CO<sub>2</sub>/g Blatt während 10 Min.

I: *Nymphaea Sansiveriensis*; II: *Nymphaea lotus*.

Es war also offensichtlich nicht gleichgültig, wie lange die Ascorbinsäure auf das Blattgewebe einwirkte. Während bei kürzeren Einwirkungszeiten eine deutliche Förderung zu beobachten war, erniedrigte lange Ascorbinsäureeinwirkung die AssimilationsgröÙe.

### B. Versuche an Freiland-Seerosen

Die für diese Versuche verwendeten Pflanzen entstammten dem großen Nymphaeaceen-Becken im Schmuckhof des Botanischen Gartens in München.

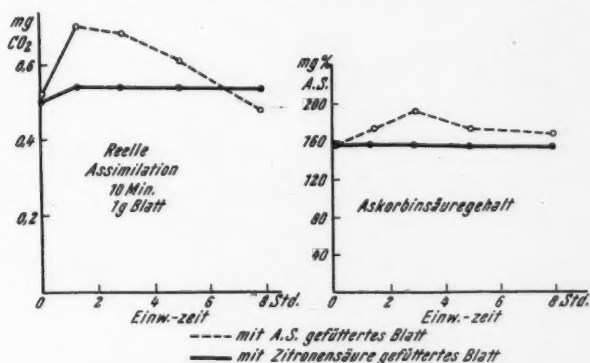


Abb. 5. *Nymphaea alba* cult. Froebeli.

Bei der Durchführung dieser Versuche wurden von vornherein verschiedene Einwirkungszeiten in Betracht gezogen.

Um zu untersuchen, ob die assimilationsfördernde Wirkung der Ascorbinsäure auf eine pH-Verschiebung zurückgeht oder ob eine spezifische Wirkung des Vitamin C vorliegt, wurden die Kontrollblätter auf eine Zitronensäure- oder Oxalsäurelösung gegeben, die den gleichen pH-Wert wie die zur Fütterung verwendete Ascorbinsäurelösung besaß.

Die Klärung dieser Frage war grundsätzlich wichtig, denn die assimilationsfördernde Wirkung der Ascorbinsäure wurde von Egle (1950) als reiner pH-Effekt hingestellt, beruhend auf einer angeblich besseren CO<sub>2</sub>-Versorgung von Wasserpflanzen.

Aus den folgenden Diagrammen sind die Werte für die reelle Assimilation sowie der Ascorbinsäuregehalt ersichtlich.

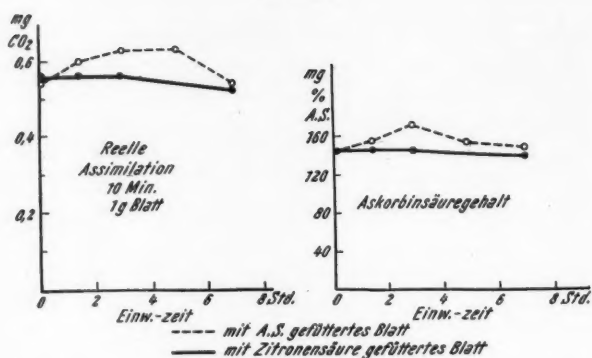


Abb. 6. *Nymphae-Bastard* cult. William Frobisher (*N. marliacea ignea* × *N. leydeckeri*).

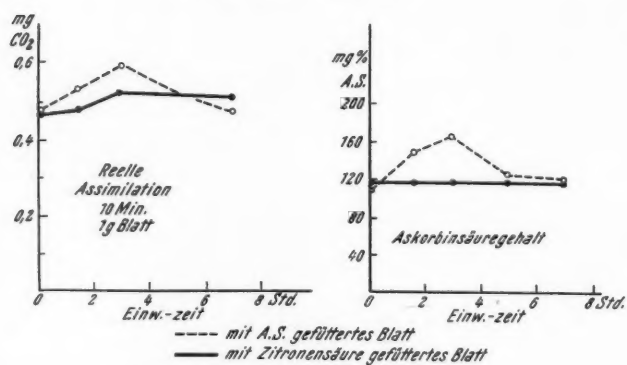


Abb. 7. *Nymphaea-Bastard* cult. Murillo.

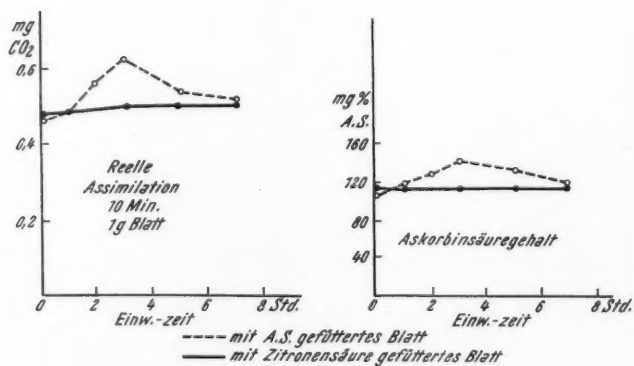


Abb. 8. *Nymphaea lucida*.

## C. Versuche an Landpflanzen

Da die Ascorbinsäureaufnahme mit dem Transpirationsstrom erfolgte, lag die Vermutung nahe, daß auch die Blätter von Landpflanzen zur Fütterung geeignet seien. Der erste Versuch dieser Art wurde mit Pelargonienblättern durchgeführt. Bei diesem Versuch war die Versuchsanordnung noch nicht so vervollkommen wie eingangs beschrieben. Hier wurden einfach verschiedene Blätter der gleichen Pflanze verschieden lang mit Ascorbinsäure behandelt und dann sofort die Assimilationsmessungen durchgeführt. Parallel zu diesen Proben wurden Kontrollblätter mit Oxalsäurelösung von gleichem pH gefüttert.

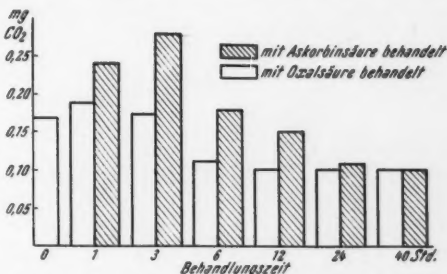


Abb. 9. Apparente Assimilation von Pelargonium (1 g Blatt 10 Minuten Assimilationszeit).

Das Versuchsergebnis ist in Abb. 9 und 10 niedergelegt.

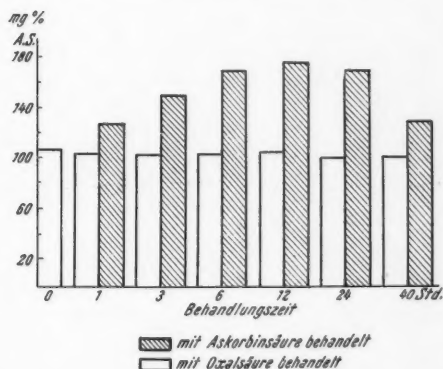


Abb. 10. Ascorbinsäuregehalt bei Fütterung von Pelargonien.

Eine eindeutige Reaktion zeigten auch die Blätter von *Acer insigne*, die schon sehr frühzeitig entwickelt waren. Die Versuche an dieser Pflanze wurden um den 20. April 1952 durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind aus Abb. 11 ersichtlich.

Bei dieser Versuchspflanze fällt auch auf, daß die Atmungswerte relativ hoch sind. Es ist sicher anzunehmen, daß diese Erscheinung auf die Jahreszeit zurückzuführen ist.

Entsprechende Versuche wurden noch an folgenden Pflanzen durchgeführt:

*Tilia spectabilis* (Abb. 12).

*Parthenocissus Veitchii* (Abb. 13).

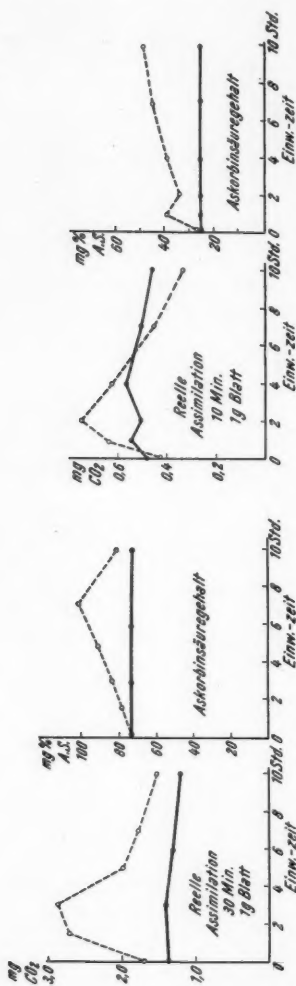
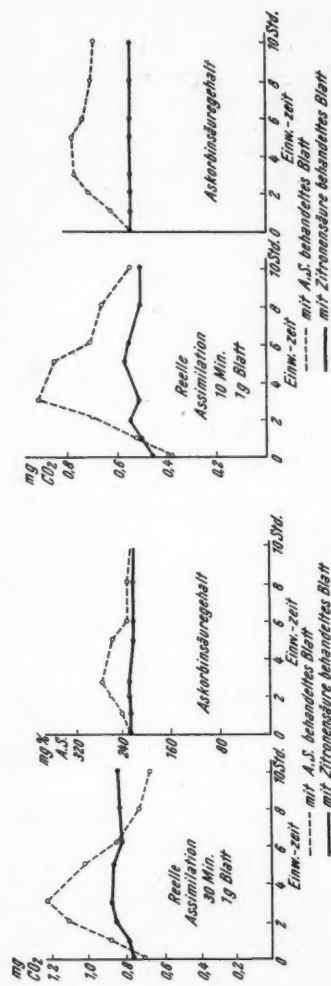
*Aristolochia siphon* (Abb. 14).

Die Behandlung mit Ascorbinsäure zeigt also bei nahezu allen untersuchten Objekten einen deutlich sichtbaren Einfluß:

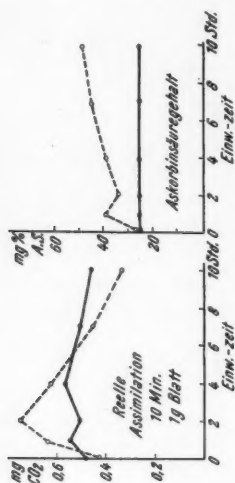
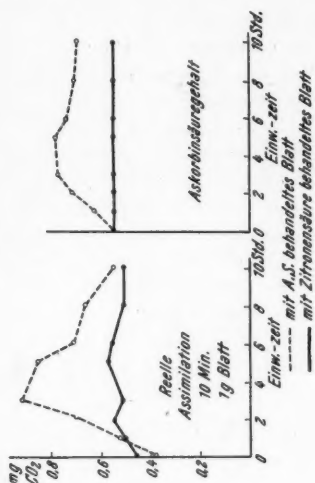
In den ersten Stunden der Einwirkung erfolgt ein starker Anstieg der Assimilationsintensität. Dieser Anstieg ist weit größer als der als „Induktionsperiode“ deutbare und bekannte Assimilationsanstieg der Kontrollblätter.

Bei fast allen untersuchten Pflanzen wurde bei 3 Stunden ein Maximum der realen Assimilation erreicht. Abweichend davon verhielt sich nur *Parthenocissus*.

Bemerkenswert ist, daß bei den untersuchten Seerosenblättern und auch bei einigen Blättern von Landpflanzen das Assimilationsmaximum zeitlich mit dem höchsten Askorbinsäuregehalt zusammen-

Abb. 11. *Acer insigne*.Abb. 12. *Tilia spectabilis*.

fällt. Der Großteil der untersuchten Landpflanzenblätter zeigt jedoch keine absolute Übereinstimmung der beiden Maxima. Diese Abweichung läßt sich wohl durch die gegenüber den Schwimmblättern viel langsamere Aufnahme von Askorbinsäure ausschließlich durch den Stiel erklären. Da bei diesen

Abb. 13. *Parthenocissus Vitellina*.Abb. 14. *Aristolochia siphon*.

Pflanzen das Assimilationsmaximum stets früher liegt, kann angenommen werden, daß die für die Assimilation optimale Ascorbinsäurekonzentration bei diesen Pflanzen bereits früher erreicht wird und eine weitere Zufuhr sich nicht mehr fördernd auswirkt. Bei den Seerosenblättern jedoch besteht die Möglichkeit, daß eine weitere Erhöhung des Ascorbinsäurespiegels über das in den Versuchen erreichte Ausmaß eine noch günstigere Beeinflussung der Assimilation mit sich bringen könnte.

Auch auf die Atmung hat sich die Erhöhung des Ascorbinsäuregehaltes deutlich ausgewirkt. Ascorbinsäureerhöhung hatte fast stets bemerkenswerte Atmungssteigerung zur Folge (vgl. Bukatsch 1952). Im Gegensatz zur Assimilationssteigerung blieben jedoch die erhöhten Atmungswerte auch bei längeren Einwirkungszeiten erhalten.

#### D. Versuche mit dem Ultrarotabsorptionsschreiber

Um die vorstehend beschriebenen Vorgänge mit einer moderneren, selbsttätig und genauer arbeitenden Methode zu überprüfen, wurden Blätter von *Nymphaea mexicana* (aus Gewächshauskultur) in der bekannten Weise mit Ascorbinsäure angereichert. Hierauf wurde deren Atmung und Assimilation sowie diejenige von Kontrollblättern mit dem Ultrarotabsorptionsschreiber (URAS) gemessen.

Für die Überlassung der Apparatur sowie für die jederzeit freundlich erteilten Ratschläge bezüglich ihrer Bedienung darf ich Herrn Prof. Dr. Huber, dem Leiter des Forstbotanischen Institutes der Universität München, meinen Dank aussprechen.

Die Verwendung des „URAS“ in der experimentellen Assimilationsforschung ist ja schon des öfteren zur Diskussion gestanden (Egle und Schenk 1951).

Die Versuchsanordnung entsprach der Abb. 1; nur trat an Stelle der Barytlaugenabsorptionsröhren die Absorptionsanlage für die Infrarotstrahlung mit den zugehörigen Nebenapparaturen. Da mir ein Gaswechselschreiber mit automatischer Umschaltung zur Verfügung stand, konnten drei Gasströme nebeneinander analysiert werden.

Die Werte der Kurven in Abb. 15 geben diese Versuchsreihe wieder. Alle Größen sind Mittelwerte von etwa zehn Messungen.

An den Kurven sind in nahezu typischer Weise die Erscheinungen wiederzuerkennen, die schon bei den früher besprochenen Versuchen zu beobachten waren. So findet man deutlich die starke anfängliche Assimilationssteigerung, während nach einem in drei Stunden erreichten Maximum die Photosynthese stärker abfällt als bei der Kontrolle. Auch eine Atmungserhöhung, die längere Zeit bestehen blieb, war festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Meßreihe haben also die im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Versuche bestätigt. Auch mit dieser, sicher sehr genau arbeitenden Methode zeigte sich die bereits dargelegte Beeinflussung von Assimilation und Atmung bei Anreicherung von Blättern mit Vitamin-C-Lösungen.

Um den Wirkungsmechanismus der Ascorbinsäure in der grünen Pflanzenzelle näher zu analysieren, wurden noch folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Prüfung des pH-Wertes in der Zelle im Verlauf der „Fütterung“;
2. quantitative Bestimmung des Chlorophyllgehaltes im Verlauf der „Fütterung“;

3. quantitative Bestimmung des Kohlehydratgehaltes im Verlauf der „Fütterung“;
4. Messung der Plasmaviskosität bei Erhöhung des Askorbinsäuregehaltes.

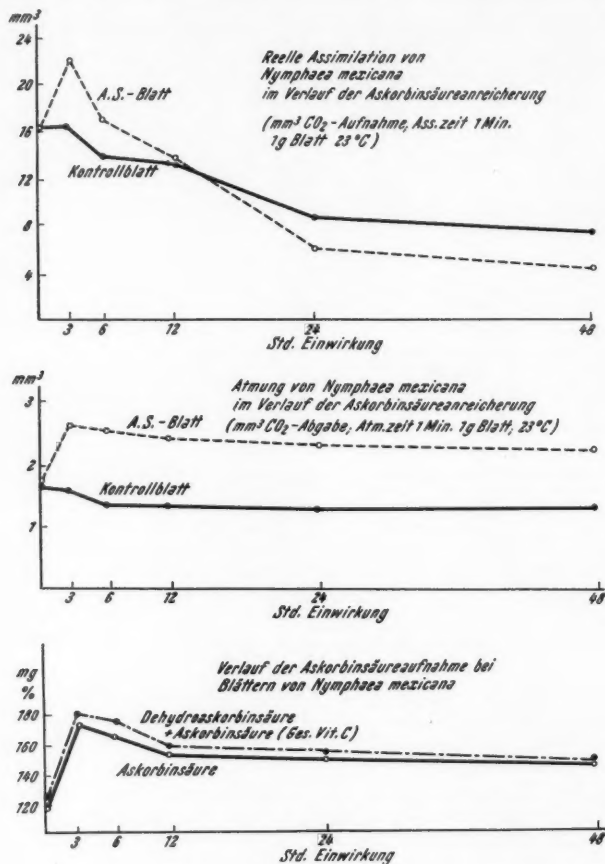


Abb. 15.

## II. Der pH-Wert des Zellsaftes im Verlauf der Askorbinsäureanreicherung

Egle (1950) ist auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß gekommen, die Assimilationserhöhungen einiger Wasserpflanzen bei Zugabe von Askorbinsäure in das Wasser, in dem sie schwammen, sei indirekt zurückzuführen auf eine Veränderung des pH-Wertes durch Freisetzung von  $\text{CO}_2$  aus Bikarbonat. Um dieser Fehlermöglichkeit auszuweichen, wurden bei den vorher beschriebenen Versuchen die Kontrollblätter bei gleichem pH wie die gefütterten Blätter gehalten.



Es war daher von vornherein nicht anzunehmen, daß die Atmungs- und Assimilationsänderungen durch pH-Verschiebungen zustande gekommen sind. Trotzdem wurde an einigen Pflanzen die Wasserstoffionenkonzentration der Preßsäfte verschieden lang mit Ascorbinsäure behandelter Blätter festgestellt.

Die Messungen wurden mit einer Chinhydron-Kalomelektrodenanordnung für kleinste Flüssigkeitsmengen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in nachfolgenden Tabellen zusammengefaßt:

*Aristolochia sipho* (mit Ascorbinsäure behandelt):

Behandlungszeit											
Stunden	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zellsaft pH:	5,63	5,61	5,59	5,59	5,58	5,60	5,60	5,58	5,59	5,58	5,58

*Parthenocissus Veitchii* (mit Ascorbinsäure behandelt):

Behandlungszeit										
Stunden	0	1	2	3	4	5	7	9	10	
Zellsaft pH:	3,72	3,70	3,70	3,69	3,70	3,71	3,69	3,68	3,68	

*Pelargonium* (mit Ascorbinsäure behandelt):

Behandlungszeit									
Stunden	0	1	2	3	4	5	6	8	10
Zellsaft pH:	3,96	3,94	3,95	3,92	3,92	3,92	3,92	3,92	3,92

Es zeigte sich also, daß keine wesentliche pH-Erniedrigung des Zellsaftes durch die Ascorbinsäurefütterung erfolgte. Offensichtlich reicht das Pufferungsvermögen der Zelle aus, um die schwache Säure genügend abzupuffern.

### III. Chlorophyllgehalt im Verlauf der Ascorbinsäurezufuhr

Auf Grund zahlreicher Versuche an Grünalgen kam Algeus (1946) zu dem Schluß, daß eine assimilationsfördernde Wirkung der Ascorbinsäure zwar vorhanden sei, daß diese Wirkung aber indirekt über eine Erhöhung des Chlorophyllgehaltes erfolge.

Es war zwar nicht zu erwarten, daß innerhalb der kurzen Einwirkungszeiten bei den vorliegenden Assimilationsversuchen eine Veränderung des Chlorophyllgehaltes stattfand; dennoch sollte an einem geeigneten Objekt diese Frage untersucht werden.

Als Versuchsmaterial waren die gefingerten Blätter von *Parthenocissus quinquefolia* günstig.

Bei den Versuchen konnte nachgewiesen werden,

1. daß in allen Teilblättchen von *Parthenocissus quinquefolia* gleichviel Ascorbinsäure und Chlorophyll vorhanden ist;
2. daß eine gleichmäßige Aufnahme von Ascorbinsäure bei „Fütterung“ erfolgt.

Nach verschiedenen Einwirkungszeiten von Ascorbinsäure wurde je ein Teilblättchen abgenommen und auf den Chlorophyllgehalt hin überprüft. 200 mg Blattsubstanz ergaben in 20 cm<sup>3</sup> Methanol extrahiert folgende Extinktionswerte (E. 20 mm Schicht; Filter S. 66). Die kolorimetrische Messung erfolgte im Pulfrich-Photometer:

1. Teilblatt bei	0 Std. Einw.-Zeit:	E: 1,21	
2. " " "	1,5 " " "	E: 1,16	Mittel aus je zehn Messungen von fünf verschiedenen Blättern
3. " " "	5 " " "	E: 1,16	
4. " " "	5 " " "	E: 1,17	
5. " " "	7 " " "	E: 1,17	

Damit war also nachgewiesen, daß bei höheren Pflanzen innerhalb kürzerer Einwirkungszeiten (bis zu 7 Stunden) kein nennenswerter Betrag an Chlorophyll durch Ascorbinsäureinwirkung abgebaut wird, aber auch von einem Aufbau keine Rede sein kann.

#### IV. Kohlehydratgehalt der Blätter im Verlauf der Ascorbinsäurezufuhr

Die Bestimmung der Kohlehydrate erfolgte nach der Methode von Bertrand (Klein 1931), also durch Reduktion von  $\text{Cu}^{++}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Die Abnahme der Blätter erfolgte am frühen Morgen; zu einer Zeit also, in der noch keine nennenswerten Zuckermengen gebildet sein konnten. Die genau abgewogenen Blätter wurden mit einer gemessenen Menge kochenden Wassers abgetötet. Dabei kam es auch zur Ausfällung von störenden, reduzierenden Eiweißstoffen. Nach dem Verreiben der Blätter und Filtrieren des Extraktes erfolgte die Einwirkung der  $\text{Cu}(\text{II})$ -Seignettesalzlösung sowie der schwefelsauren Eisen-(III)-Salzlösung in der vorgeschriebenen Konzentration und Zeit. Das entstehende  $\text{Fe}^{++}$  wurde mit  $1/10\text{ n}$ -Kaliumpermanganatlösung rücktitriert.

Auf diese Weise wurden jedoch nur die reduzierenden Monosaccharide erfaßt. Um genaue Werte über die Kohlehydratbilanz zu erhalten, mußten auch die vorhandenen Disaccharide und Polysaccharide (Stärke) quantitativ bestimmt werden. Für die quantitative Analyse der Disaccharide wurde der Blattextrakt 1 Stunde lang bei  $100^\circ\text{C}$  auf dem Wasserbad mit 20%iger Zitronensäure hydrolysiert. Für die Bestimmung der Stärke erfolgte eine Hydrolyse von 1 Stunde Dauer bei  $100^\circ\text{C}$  mit 25%iger Salzsäure (vgl. Marthaler 1934).

Eine Schwierigkeit ergab sich bei diesen Untersuchungen insofern, als die während der Fütterung aufgenommene Ascorbinsäure sich (bei Probeversuchen) als sehr wirksames Reduktionsmittel erwies. Um also einwandfreie Kohlehydratwerte zu erhalten, mußte die Ascorbinsäure durch Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol jeweils mitbestimmt werden. Eine empirisch ermittelte Eichkurve gab dann jeweils darüber Aufschluß, welche Menge reduzierten Kupfers auf Ascorbinsäurereduktion zurückzuführen war.

Bei den aus den folgenden Kurven ersichtlichen Werten sind die durch Ascorbinsäure reduzierten Kupfermengen bereits abgezogen. Es handelt sich also um reine Kohlehydratreduktionen (Abb. 16–20).

Bei den folgenden Diagrammen bedeutet:

- I. Monosaccharide (M),
- II. Monosaccharide + Disaccharide (M + D),
- III. Monosaccharide + Disaccharide + Polysaccharide (Stärke) (M + D + P).

Das Auffallendste an den erhaltenen Werten ist zunächst das annähernd gleichmäßige Ansteigen von Kohlehydratgehalt und Ascorbinsäuregehalt bis zu einem meist gemeinsamen Maximum nach drei Stunden Einwirkungszeit.

Wie die Kurven zeigen, setzt nach etwa drei Stunden ein wesentlich gesteigerter Umbau von Monosacchariden in Disaccharide und Polysaccharide

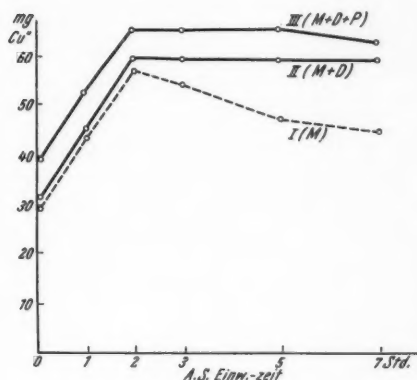


Abb. 16. Kohlenhydratgehalt im Verlauf der Ascorbinsäurezufuhr bei Schwimmblättern von *Nymphaea*-Bastard William Frobisher. Fütterung bei 20.000 LUX. mg Cu<sup>++</sup> reduziert von 1 g Blattsubstanz.

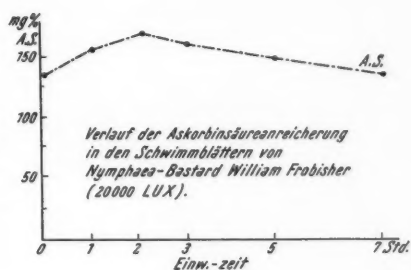


Abb. 17.

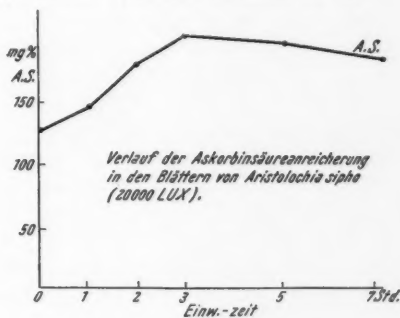


Abb. 19.

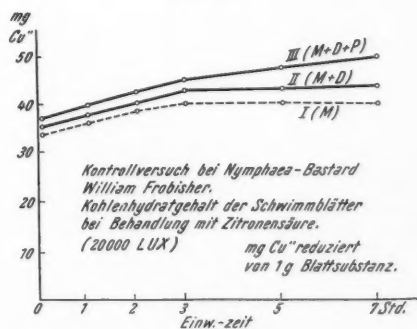


Abb. 18.

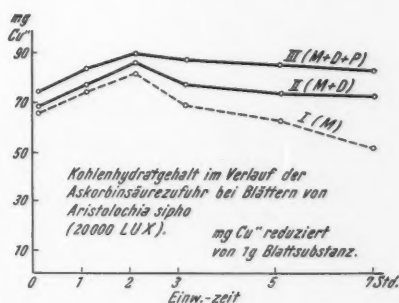


Abb. 20.

steht aber auch die Möglichkeit, daß der Monosaccharidgehalt nur infolge der zunehmend gesteigerten Atmung absinkt.

In ähnlichem Sinne lassen sich die Befunde von Moldtmann (1939/40) deuten. Dieser Autor beobachtete eine Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration in der Pflanze bei künstlicher Zufuhr von Kohlehydraten, insbesondere von Glucose. Dieses Ergebnis spricht sehr für eine Entstehung der Ascorbinsäure aus Zuckern; sehr wahrscheinlich besteht in der Zelle ein Gleichgewicht: Ascorbinsäure  $\rightleftharpoons$  Zucker.

Hagen (1952) fand bei Untersuchungen über die Tagesrhythmik des Ascorbinsäuregehaltes von höheren Pflanzen keine sicheren Beziehungen zwischen Kohlehydrat- und Ascorbinsäuregehalt.

Das Verhalten der Versuchspflanzen war sehr stark davon abhängig, ob die Fütterung bei starkem oder schwachem Licht durchgeführt wurde. Behandelt man die Blätter bei schwachem (3000 Lux) oder sehr schwachem Licht (500 Lux) mit Ascorbinsäure, so findet eine sehr viel geringere oder nahezu überhaupt keine Erhöhung des Kohlehydratgehaltes statt. Allerdings ist auch hier der Ascorbinsäurespiegel etwas weniger erhöht als bei Fütterung in starkem Licht.

Aus diesen Versuchsergebnissen kann man folgern, daß die Erhöhung des Zuckergehaltes eine Folge der durch die Ascorbinsäureeinwirkung hervorgerufenen verstärkten Assimilation ist. Die Ascorbinsäure wirkt also auf dem Weg über die Photosynthese auf den Kohlehydratgehalt der Pflanze.

An diesem Verhalten sieht man wieder die merkwürdige Doppelstellung der Ascorbinsäure in der Pflanze: einerseits wird sie sicher über gewisse zuckerartige Verbindungen in der Pflanzenzelle gebildet, andererseits regt sie indirekt — über die Photosynthese — die Bildung von Kohlehydraten an. Einerseits erscheint sie mittelbar als ein Assimilat, andererseits als ein wirksamer Beschleuniger des Assimilationsvorganges.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Erhöhung des Kohlehydratgehaltes ausreicht, um das aus den Versuchen des ersten Abschnittes hervorgehende Absinken der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme nach etwa dreistündiger oder längerer Behandlung mit Ascorbinsäure durch Kohlehydratanreicherung zu deuten. Theoretisch wäre es erklärlich, daß eine starke Erhöhung insbesondere der löslichen Kohlehydrate eine Assimilationsstauung hervorrufen kann.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden Seerosenblätter, anstatt wie bisher mit Ascorbinsäure, mit Glucoselösung (Verdünnung 1 : 1000) gefüttert. Das Ergebnis war folgendes:

*Nymphaea*-Bastard cult. Wiliam Frobisher (*N. marliacea ignea*  $\times$  *N. leydeckeri*) mit Glucoselösung behandelt. Assimilation und Atmung in mg  $\text{CO}_2$  pro g Blatt und Minute:

Behandlungszeit	Relativer Glucosegehalt	Appar. Ass.	Reelle Ass.	Atmung
0 Std.	100%	0,514	0,526	0,212
1,5 „	122%	0,288	0,510	0,222
5 „	151%	0,264	0,495	0,231

*Nymphaea alba* cult. *Froebeli* (behandelt wie oben).

Behandlungszeit	Relativer Glucosegehalt	Appar. Ass.	Reelle Ass.	Atmung
0 Std.	100%	0,312	0,534	0,222
1,5 „	127%	0,291	0,521	0,230
3 „	135%	0,262	0,505	0,241

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß eine Erhöhung des Glucosegehaltes von Blättern ein Absinken sowohl der apparenten als auch der realen Assimilation bewirkt. Die Atmung der Blätter wurde durch Glucoseeinwirkung deutlich erhöht. Daraus ergeben sich zwei wichtige Gesichtspunkte:

1. Das Absinken der Assimilationsintensität nach dreistündiger Behandlung mit Ascorbinsäure kann auf eine starke Glucoseanreicherung in der Zelle (als Folge einer verstärkten Photosynthese) zurückgehen.

2. Aus den Versuchen geht hervor, daß die Wirkung der Ascorbinsäure auf den Assimilationsvorgang eine grundlegend andere ist als die der Glucose. Wäre die Ascorbinsäure ein „funktionsloses Assimilat“ (vgl. Seybold u. Mehner 1948; Egle 1950), so müßte die Wirkung auf die Assimilation aller Voraussicht nach ähnlich sein wie die der Glucose. Man kann schon rein theoretisch fordern, daß die Konzentrationserhöhung eines Reaktionsproduktes nach dem Massenwirkungsgesetz das Gleichgewicht der Reaktion nach der anderen Seite hin verschiebt. In der Tat hat auch die Anreicherung mit Glucose eine Verschiebung des Gleichgewichtes nach links, d. h. eine Verminderung der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ergeben. Da aber die Wirkung der Ascorbinsäureanreicherung, wie in den vorausgehenden Versuchen beschrieben, eine prinzipiell andere war, kann Vitamin C nicht als bloßes Assimilat bezeichnet werden.

## V. Veränderung der Plasmaviskosität bei Ascorbinsäurezufuhr

Bei den Ascorbinsäurebestimmungen war auffallend, daß immer jener Blattextrakt leichter filtrierbar war, der mit Ascorbinsäure angereichert war. Es schien also, als ob die Viskosität des Zellinhaltes durch Ascorbinsäurezufuhr erniedrigt würde.

Um diese Erscheinung quantitativ verfolgen zu können, wurde die von Struger (1949) beschriebene Methode der Chloroplastenverlagerung durch Zentrifugieren gewählt. Da sich Schnitte durch das Blattgewebe wegen der Ungleichartigkeit der Zellen als ungeeignet erwiesen, wurde die Chloroplastenverlagerung an Blättern des Wassermooses *Fontinalis* durchgeführt. Die zarten, aus nur einer Zellschicht aufgebauten Blättchen dieser Pflanze wurden zum Teil in Ascorbinsäurelösung (Verdünnung 1:1000), zum Teil in Zitronensäurelösung von gleichem pH-Wert gelegt. Nach einer Einwirkungszeit von 2 bis 3 Stunden war ein deutlicher Unterschied in der Viskosität des Protoplasmas der beiden Proben nachweisbar. Während bei der Kontrollprobe ein drei Minuten langes Zentrifugieren gerade den Beginn der Chloroplastenverlagerung erkennen ließ, waren die Chloroplasten in der mit Ascorbinsäure behandelten Probe längst deutlich verlagert. Die Tourenzahl der Zentrifuge betrug 1750/Min.

Eine Ascorbinsäurebestimmung ergab, daß der Gehalt in der mit Ascorbinsäure behandelten Probe um 24% höher war als in der Kontrolle.

Wichtig war bei diesen Versuchen, daß stets gleich alte Pflanzenteile miteinander verglichen wurden, denn mit zunehmendem Alter ändert sich die Plasmaviskosität in der Zelle sehr stark. Auf den beiden Mikroaufnahmen (Abb. 22 a, b) ist der Versuch wiedergegeben. Abb. 21 b zeigt die Kontrolle, die mit Zitronensäure behandelt wurde. Bei der Kontrolle zeigen die Zellen des Blattrandes nach dem 150 Sekunden langen Zentrifugieren eine beginnende Chloroplastenverlagerung. Gegen die Mitte des Blattes zu ist

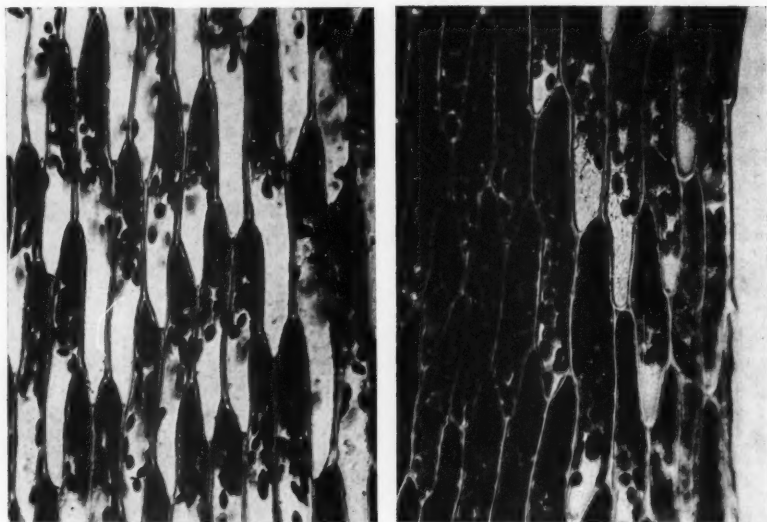


Abb. 21 a, b.

noch keine Veränderung zu erkennen. Bei einem Moosblättchen, das genau so lange zentrifugiert wurde, sich jedoch vorher 2½ Stunden in einer Ascorbinsäurelösung (1:1000) befand, hat in sämtlichen Zellen das Zentrifugieren eine weitgehende Verlagerung der Zellelemente hervorgerufen.

Als weiteres Versuchsobjekt eigneten sich die ebenfalls nur aus einer Zellschicht aufgebauten Blätter von *Trichomanes prolifer* (*Hymenophyllac.*). Hier war besonders schön eine leichtere Zentrifugierbarkeit der leitbündelnahen Zellen zu beobachten. Offenbar war in diesen Zellen durch Zufuhr von den Leitbahnen her der Ascorbinsäuregehalt größer.

Mit dieser Viskositätsverminderung des Plasmas übt die Ascorbinsäure wohl eine Art „Wuchsstoffwirkung“ aus. Eine solche Wuchsstoffwirkung wurde schon von Raadts (1947/48) beobachtet und als Auxinaktivierung gedeutet. Mit der Erniedrigung der Viskosität der lebenden Substanz wird eine tiefgreifende Wirkung auf die gesamte Hydratur und Stoffwechsellage des Blattes verbunden sein.



Vermutlich wirkt diese Viskositätsniedrigung assimilationssteigernd, denn die Zufuhr von Nahrungstoffen und die Abfuhr von Reaktionsprodukten dürfte dadurch wesentlich gefördert werden (vgl. Bukatsch 1937). Dennoch wird der starke Assimilationsanstieg auf diese Weise kaum erklärlich sein.

Durch die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Plasmaviskosität werden wohl noch Nebenreaktionen hervorgerufen, die die Erforschung der Beziehungen zwischen Assimilation und Ascorbinsäure noch verwickelter gestalten.

## VI. Versuche mit isolierten Chloroplasten

Für die moderne Assimilationsforschung hat sich neben der Verwendung radioaktiven Kohlenstoffs („Tracer Method“) das Studium isolierter, belichteter Chloroplasten als einer der erfolgreichsten Wege erwiesen. Grundlegend für diese Forschungsrichtung waren die Arbeiten von Hill (1939, 1940) sowie von Warburg (1946), aus denen sich ergeben hat, daß isolierte Chloroplasten im Licht gewisse Wasserstoffakzeptoren, wie Eisen-III-salze oder Chinon, zu reduzieren imstande sind.

Mit der Suche nach zelleigenen „Hill-Reagentien“ hat sich unter anderem auch Mehler (1951) beschäftigt. Er hat nachgewiesen, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen (Ausschaltung von Cytochromoxydase) zelleigenes Cytochrom c als Wasserstoffakzeptor in Frage kommen könnte.

Besonders fruchtbar war auch das Versuchsergebnis von Tolmach (1951) sowie von Vishinac und Ochoa (1951), welches gezeigt hat, daß auch Codehydrase (TPN) den von den Chloroplasten kommenden Wasserstoff aufnehmen kann. (Vgl. hierzu das Schema auf Seite 254.)

Ausführliche Daten über das Arbeiten mit isolierten Chloroplasten sind den Veröffentlichungen von Clendenning und Gorham (1950; I, II, III) zu entnehmen.

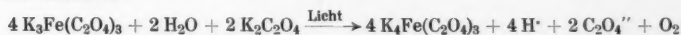
Clendenning und Gorham erhielten bei ihren Versuchen eine Reduktion von Hill-Reagens auch im Dunkel, wenn zur Chloroplastensuspension neutrale Lösungen von Ascorbinsäure, Glutathion oder Tanninen zugesetzt wurden. Lösungen reduzierender Zucker waren zu dieser Reaktion nicht befähigt. Als Hill-Reagens diente ein Gemisch von Ferrioxalat und Ferrieyanid. Dieser Vorgang wird von den Autoren folgendermaßen formuliert:



Dabei kann z. B.  $\text{RH}_2$  Ascorbinsäure und R Dehydroascorbinsäure sein.

Es konnte also durch Zusatz dieser Wasserstoffdonatoren auch im Dunkel ein Reaktionsverlauf ähnlich wie bei der Hill-Reaktion erzielt werden. Der Hauptunterschied liegt nur in der verschiedenen Herkunft des Wasserstoffs.

Hill-Reaktion:



Eine besondere Beachtung gebührt auch den bereits erwähnten Arbeiten von Mehler (1951). Dieser Autor hat gezeigt, daß unter geeigneten Bedingungen aus Sauerstoff als Akzeptor für den aus der Wasserspaltung hervorgehenden Wasserstoff dienen kann. Dabei mußte in einem Fall Chinon, im anderen Versuch Äthylalkohol + Katalase zum Reaktionsgemisch gegeben werden.

Weiterhin konnte Mehler zeigen, daß bei Gegenwart von Chloroplasten Chinon durch Ascorbinsäure reduziert werden konnte. Dabei wurde Sauerstoff auf-

genommen. Durch Zugabe von Katalase + Äthylalkohol erfolgte jedoch eine doppelt so große Sauerstoffaufnahme (2 Mol  $O_2$  pro Mol Ascorbinsäure).

Es schien nun interessant zu prüfen, wie sich Chloroplasten allein der Ascorbinsäure (ohne Chinon oder andere Zusätze) gegenüber verhalten.

Die Herstellung des Chloroplastenmaterials gelang durch feines Zerreiben junger Spinatblätter mit Quarzsand und nachfolgendes fraktioniertes Zentrifugieren. Nach dem Herauslösen der Chloroplasten aus dem Zentrifugenglas wurden sie mehrmals mit einer Phosphatpufferlösung (pH = 4,9) gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Zur Messung der Chloroplastenaktivität diente die manometrische Methode nach Warburg-Barcroft. Durch 20%ige Kalilauge in der seitlich angebrachten Birne wurde in den Warburg-Gefäßen der  $CO_2$ -Partialdruck ausgeschaltet.

Bei sämtlichen Versuchen war der Chlorophyllgehalt der Chloroplastensuspensionen der gleiche (Überprüfung mit dem Pulfrich-Photometer).

Bei der ersten Versuchsreihe wurde zu jeder Probe (Chloroplasten aus 200 mg Blattsubstanz) 0,925 mg Ascorbinsäure gegeben. Nach einstündiger Behandlung der Chloroplasten bei einer Beleuchtung von 12.000 Lux erfolgte eine erneute Titration auf Ascorbinsäure. Dabei hatten sich die Mengen wie folgt geändert:

	A. S. zu Beginn mg	A. S. nach 1 Stunde mg	A. S.- Abnahme mg	$O_2$ -Auf- nahme in dies. Zeit mg	Prozentuale $O_2$ -Aufnahme i. Vgl. z. Menge, die d. A. S.- Oxydat. entspr.
1. Probe	0,925	0,655	0,270	0,0185	76%
2. Probe	0,925	0,631	0,294	0,0170	66%
3. Probe	0,925	0,672	0,253	0,0165	72%
4. Probe	0,925	0,684	0,241	0,0180	82%
5. Probe	0,925	0,665	0,260	0,0168	70%
6. Probe	0,925	0,658	0,267	0,0186	78%

Kontrollversuch (Ascorbinsäure ohne Chloroplasten)

7. Probe	0,925	0,897	0,028	0,0014	—
8. Probe	0,925	0,908	0,017	—	—

Es erfolgt also ein rascherer Abbau der Ascorbinsäure durch die Tätigkeit der Chloroplasten. Dieser Abbau geht unter Sauerstoffaufnahme vor sich. Eine theoretische Erklärung für die ablaufenden Reaktionen findet man auf Seite 212. Nach diesen Reaktionsgleichungen ist in der letzten Spalte der obigen Tabelle die Sauerstoffaufnahme prozentual auf die theoretisch aus dem Ascorbinsäureabbau zu fordernde Menge bezogen.

Der geringere Sauerstoffverbrauch im Verhältnis zu dem beobachteten Ascorbinsäureschwund kann verschiedene Gründe haben. Ein nicht unwesentlicher methodischer Fehler dürfte darin zu suchen sein, daß zwischen Ascorbinsäurezusatz und Messung des ersten  $O_2$ -Druckes in der Warburg-Apparatur mindestens 10 Minuten vergingen. Während dieser Zeit wurde also schon Sauerstoff aufgenommen, entgegen aber der Messung. Durch Verwendung von Warburg-Gefäßen mit Einsatz

hätte dieser Fehler vermieden werden können; solche Gefäße standen aber nicht zur Verfügung.

Sauerstoffaufnahme und Ascorbinsäureschwund waren lichtabhängige Vorgänge. Das geht aus der folgenden Darstellung hervor.

Es findet ein geringer Ascorbinsäureverlust auch im Dunkeln statt; dieser Dunkelabbau kann aber nahezu auf Null reduziert werden, wenn man die zur Isolierung verwendeten Spinatblätter vorher 24 Stunden im Dunkeln aufbewahrt. Allerdings ist dann auch die Aktivität der Chloroplasten bei Belichtung geringer. Die nachstehende Kurve (Abb. 23) gibt das Verhalten solcher Chloroplasten wieder.

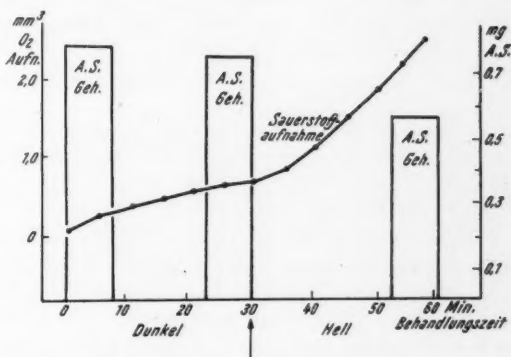


Abb. 22. Sauerstoffaufnahme und Ascorbinsäureabbau isolierter Chloroplasten.

Es besteht die Möglichkeit, das durch die beiden Kurven dargestellte

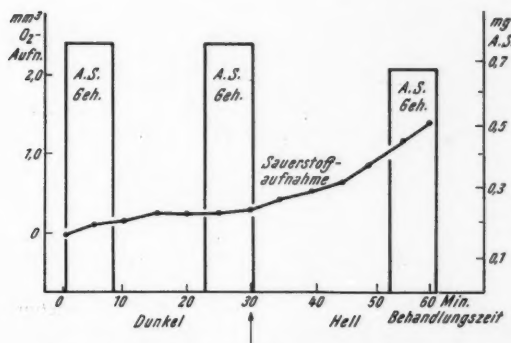


Abb. 23. Sauerstoffaufnahme und Ascorbinsäureabbau isolierter Chloroplasten (Blätter vorher 24 Stunden verdunkelt).

unterschiedliche Verhalten dadurch zu erklären, daß beim ersten Versuch veratembare Stoffe zugegen waren, die bei der zweiten Versuchsreihe durch das vorherige Aufbewahren der Blätter im Dunkeln entfernt waren. Allerdings bleibt auch während der Dunkelheit der Ascorbinsäuregehalt praktisch unverändert. Clendenning und Gorham (1950) beschreiben, daß bei ihren Versuchen die

Aktivität der isolierten Chloroplasten in Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren (French) unabhängig von vorheriger Belichtung oder Verdunklung war.

Während also die Oxydation von Ascorbinsäure durch ein in isolierten Chloroplasten wirksames System recht sicher nachzuweisen war, was ja

auch den Ergebnissen Arnons (1948) entspricht, der Katechin als Akzeptor zusetzte, taucht die prinzipielle Frage auf, ob denn nicht dieser Vorgang auch in der umgekehrten Richtung verlaufen kann, sobald nicht, wie bei diesem Versuch, Ascorbinsäure im Überschuß, sondern Dehydroascorbinsäure geboten wird (Gleichgewichtsverschiebung). Es sollte also versucht werden, ob dieses System in den Chloroplasten auch aus Dehydroascorbinsäure Ascorbinsäure aufbauen kann.

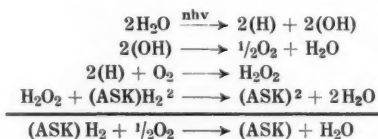
Eine methodische Schwierigkeit war die Gewinnung von Dehydroascorbinsäurelösungen. Nur bei tagelangem Durchperlen von Luft durch Ascorbinsäurelösung (z. T. bei Gegenwart von Kupfersalzsäure) gelang es, ascorbinsäurefreie Lösungen zu erhalten. Ein großer Teil der Ascorbinsäure war allerdings dann schon über die Dehydroascorbinsäure hinaus abgebaut, wie die Titration nach Schwefelwasserstoffreduktion ergab. Diese Oxydationsprodukte könnten sich unter Umständen störend auf die Messungen ausgewirkt haben.

Auch diese Versuche wurden mit der Warburg-Apparatur durchgeführt. Die auftretenden Sauerstoffdruckänderungen waren aber so klein, daß sie innerhalb der Fehlergrenze blieben<sup>1</sup>. Die Änderungen des Dehydroascorbinsäuregehaltes sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

	Dehydroascorbinsäure bei Versuchsbeginn	Ascorbinsäure vor Versuchsbeginn	Ascorbinsäure nach 60 Min. Einw. v. Chloropl.-Susp.
	mg	mg	
Probe 1	0,11	0	0,040
Probe 2	0,11	0	0,056
Probe 3	0,11	0,01	0,058
Probe 4	0,11	0,01	0,056
Probe 5	0,11	0	0,044
Kontrolle (ohne Chloroplasten)			weniger als 0,008
Probe 6	0,11	0	(kleinster titrierbarer Wert)
Kontrolle (Chloroplasten allein)			
Probe 7	0,11	weniger als 0,008	weniger als 0,008

Deutet man die Versuche analog zu den Mehlerschen Reaktionsergebnissen, so kann man die Vorgänge folgendermaßen formulieren:

1. Die Oxydation der Ascorbinsäure bei Gegenwart von isolierten Chloroplasten:

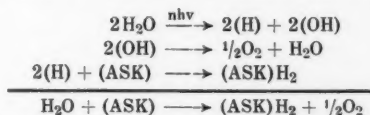


<sup>1</sup> Da wir die Chloroplasten nicht unter so schonenden Bedingungen wie die amerikanischen Autoren (d. h. unter Tiefkühlung, auch während des Zentrifugierens) gewinnen konnten, ist mit einem Aktivitätsverlust zu rechnen.

<sup>2</sup> (ASK)H<sub>2</sub> = Ascorbinsäure; (ASK) = Dehydroascorbinsäure.

In diesem Fall wurde also indirekt über  $\text{H}_2\text{O}_2$  der Wasserstoff von der Ascorbinsäure auf den Luftsauerstoff übertragen. Infolge der hohen Redox-Potentialdifferenz kann die Oxydation von Ascorbinsäure durch Wasserstoffsuperoxyd ohne weiteres erfolgen. Dieses Reaktionsschema erklärt auch die Größe des Sauerstoffverbrauches (vgl. Tab. auf S. 230) ( $\frac{1}{2}$  Mol  $\text{O}_2$  pro Mol Ascorbinsäure).

2. Die Reduktion von Dehydroascorbinsäure bei Gegenwart isolierter Chloroplasten:



Hier ist Dehydroascorbinsäure der Akzeptor für den hydrolytisch gebildeten Wasserstoff. Da die reduzierbaren Dehydroascorbinsäuremengen bei den oben beschriebenen Versuchen sehr klein waren, ist es verständlich, daß die Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes nicht zu messen waren.

Aus den Versuchen des ersten Abschnittes geht hervor, daß mit der Ascorbinsäureanreicherung keine Erhöhung des Gehaltes an Dehydroascorbinsäure verbunden ist (vgl. Abb. 15 unten). Das legt die Vermutung nahe, daß der oxydative Abbau der Ascorbinsäure sofort über die Dehydroascorbinsäure hinaus zu weiteren Oxydationsprodukten fortschreitet. Aus diesem Grund bleibt ein dauerndes Ungleichgewicht: Ascorbinsäure  $\rightleftharpoons$  Dehydroascorbinsäure aufrechterhalten. In dieser Weise erklärt sich wohl auch die schlechte Ausbeute an Ascorbinsäure bei der Behandlung der Chloroplasten mit Dehydroascorbinsäure. Zudem erfolgt ja auch ein Abbau der Dehydroascorbinsäure zu weiteren Oxydationsprodukten:

Ascorbinsäure  $\rightleftharpoons$  Dehydroascorbinsäure  $\rightleftharpoons$  Weitere Oxydationsprodukte.

Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß die Ascorbinsäure in den Chloroplasten an Vorgängen beteiligt sein kann, in deren Verlauf Wasserstoff übertragen wird. Es scheint nach unseren Versuchen, daß Ascorbinsäure-Dehydroascorbinsäure-Gemische mit Chloroplastensuspension belichtet einerseits zur Photolyse des Wassers nach der unten (S. 235) entwickelten Vorstellung beitragen können, andererseits durch den photolytisch gebildeten Wasserstoff sozusagen als Wasserstoffakzeptor hydriert werden können.

Jedenfalls treten hier deutliche Quotientenverschiebungen Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure auf, die selbstverständlich mit entsprechenden Änderungen des Redoxpotentials verknüpft sind.

Diese Redoxvorgänge könnten einen Teil im Mechanismus des Assimilationsprozesses darstellen.

## VII. Besprechung der Versuchsergebnisse

Nach den neueren Anschauungen läßt sich der Assimilationsprozeß in folgende Teilvorgänge zerlegen (zusammenfassende Arbeiten hierüber bei Rabinowitch 1951; Pirson 1949, 1953):

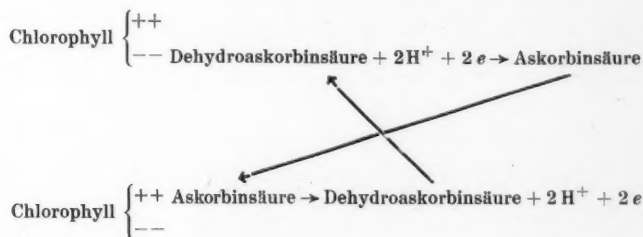
1. Dunkeleinbau von  $\text{CO}_2$ ,
2. Übertragung von Wasserstoff auf das  $\text{CO}_2$ -Einbauprodukt,



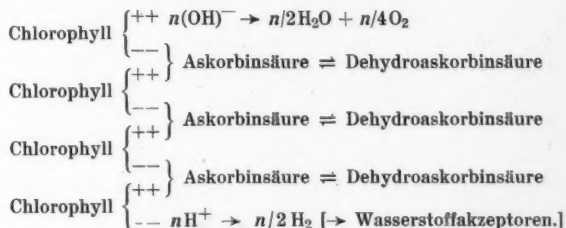


differenz erfordert, als ein polarisiertes Sensibilisatormolekül liefern kann, braucht man einen Redoxkörper als „Vorspann“. Durch seine Wirkung werden mehrere polarisierte Moleküle hintereinandergeschaltet und so die Gesamtspannung erhöht. Während Baur für seine Versuche den Redoxkörper Methylenblau/Leucomethylenblau verwendete (Zweifarbstoffversuch), hat Bukatsch (1939/40) an Hand von Modellversuchen gezeigt, daß das Redoxsystem Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure als Vorspann bei dieser Reaktion fungieren kann:

Bei Hintereinanderschaltung von  $n$  Molekülen erhöht sich die Potentialdifferenz auf das  $n$ -fache.



Bei Berücksichtigung der neueren Erkenntnisse über den Verlauf der Reaktionen bei der Assimilation wäre es nun denkbar, daß an den hintereinandergeschalteten, polarisierten Chlorophyllmolekülen eine Mikroelektrolyse des Wassers stattfindet. Man könnte sich also vorstellen, daß etwa folgende Vorgänge ablaufen würden, ein Gedanke, der erstmalig von Bukatsch (1952) geäußert wurde:



Je nach dem erforderlichen Potential (Zersetzungsspannung des Wassers) könnten in dieser Weise entsprechend viele Chlorophyllmoleküle hintereinandergeschaltet sein. Auf diese Art würde sich auch die sog. „Assimilationseinheit“ erklären lassen, wobei eine entsprechend große Zahl von Molekülen zusammenwirkt.

Inwieweit ein solcher Mechanismus bei der Wasserspaltung mit anderen Forschungsergebnissen übereinstimmt, bleibt noch abzuwarten. Offen bleibt auch, wie sich die submikroskopische Morphologie der Chloroplasten mit dieser Erklärungsweise in Einklang bringen läßt.

Eine auffallende Übereinstimmung ist besonders in Arbeiten russischer Forscher festzustellen. So haben Krassnowski und Brin (1950) gefunden, daß im Lichtabsorptionsbereich des Chlorophylls das System Chlorophyll-Ascorbinsäure ein hochwirksames Redoxsystem darstellt. Es sollen von ihm noch Verbindungen bis zu einem Redoxpotential von  $-0,32$  V reduziert werden können, während gewöhnliche Ascorbinsäure nur ein Redoxpotential von  $0,065$  V besitzt. Nähere Ausführungen über dieses interessante Ergebnis stehen leider nicht zur Verfügung, da die Originalarbeit zur Zeit nicht zugänglich ist.

Von Tolmach (1951) wurde auch bewiesen, daß bei Gegenwart von „malic enzyme“ Codehydrase mit dem so niedrigen Redoxpotential von  $-0,28$  V als Wasserstoffakzeptor bei der Hill-Reaktion noch dienen kann. Tolmach beschreibt auch, daß mit zunehmender Auswaschung der Chloroplasten Zusätze von Codehydrase wirkungslos werden.

Wittingham (1952) referiert über noch unveröffentlichte Arbeiten von Hill, Davenport und Whatley, wonach durch Herauswaschung eines spezifischen Wasserstoffakzeptors die Aktivität der Chloroplasten stark erniedrigt wird.

Vielleicht handelt es sich bei dem herauswaschbaren Stoff um die leichtlösliche Ascorbinsäure.

### IX. Zusammenfassung

1. Es wurde die Assimilationsintensität von Blättern, die durch den Transpirationsstrom mit Ascorbinsäure künstlich angereichert waren, verglichen mit der Assimilation normaler Blätter. Als Versuchspflanzen dienten vor allem verschiedene *Nymphaea*-Arten, *Aristolochia siphonophora*, *Parthenocissus Veitchii* und *Tilia spectabilis*. Die  $\text{CO}_2$ -Messung erfolgte titrimetrisch. Bei einer Versuchsreihe erfolgte die Messung des  $\text{CO}_2$ -Stoffwechsels mit dem Ultrarotabsorptionsschreiber.

2. Die Ascorbinsäure bewirkt in den ersten drei bis fünf Stunden der Einwirkung eine bedeutende Assimilationssteigerung. Nach etwa drei Stunden nimmt diese Erhöhung der Assimilationsleistung ab und die Photosynthese wird oft sogar geringer als die der Normalblätter.

3. Die Ascorbinsäurezufuhr bewirkt in den Blättern auch eine bedeutende Erhöhung der Atmung; diese bleibt aber in der Regel während der ganzen Versuchszeit erhalten.

4. Während der Ascorbinsäurezufuhr findet keine Änderung des Zellsaft-pH-Wertes sowie des Chlorophyllgehaltes der Pflanze statt. Die Assimilationssteigerung ist also nicht durch pH-Verschiebung oder Chlorophyllneubildung erklärbar.

5. Der Kohlehydratgehalt der Blätter nimmt infolge der Assimilationssteigerung stark zu.

6. Durch die Erhöhung des Ascorbinsäuregehaltes findet eine deutlich meßbare Erniedrigung der Plasmaviskosität statt.

7. Bei Gegenwart isolierter Chloroplasten aus Spinatblättern wird im Licht Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter Sauerstoffaufnahme oxidiert; die Reduktion von Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure hat

sich ebenfalls bei Gegenwart isolierter Chloroplasten im Licht durchführen lassen.

8. Alle diese Anzeichen sprechen dafür, daß der Ascorbinsäure als Redoxkörper eine maßgebende Rolle bei der Assimilation der Kohlensäure zukommt. Eine Möglichkeit des Eingreifens in den Photolysevorgang des Wassers wird erwogen.

#### Literatur

- Algeus, S., 1946: Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie der Chlorophyteen (mit besonderer Berücksichtigung der Indolylessigsäure, Ascorbinsäure und Aneurin). Botaniska Notiser 129, 184.
- Arnon, D. I., 1948: Localisation of polyphenoloxidase in the chloroplasts of *Beta vulgaris*. Nature 162, 341.
- Baur, E., 1937: Über den Verlauf der Photolyse der Kohlensäure. Helv. Chim. Acta 20, 587.
- Bukatsch, F., 1937: Einfluß des Thermalwassers von Bad Gastein auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation verschiedener Wasserpflanzen. Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-natw. Kl., Abt. I, 146, 17.
- 1939/40: Über die Rolle der Ascorbinsäure in den Chloroplasten I. Planta 30, 118.
- 1940/41: Über die Rolle der Ascorbinsäure in den Chloroplasten II. Planta 31, 209.
- 1943: Über den Ascorbinsäuregehalt der Koniferennadeln. Vitamine und Hormone 4, 192.
- 1951: Über den Einfluß verschiedener mineralischer Ernährung auf den Pigmentgehalt. Phyton 3, 173.
- 1952: Ascorbinsäuregehalt und Atmungsintensität. Phyton 4, 35.
- 1952: Die CO<sub>2</sub>-Assimilation der grünen Pflanze im Licht neuerer Anschauungen. Prakt. Schulphysik 29, 271.
- Clendenning, K. A., und P. R. Gorham, 1950: Photochemical activity of isolated chloroplasts in relation to reaction conditions. Canad. J. Res. C 28, 140.
- Egle, K., 1950: Über die Wirkung von Vitamin C auf Kohlensäureassimilation und die Atmung submerser Wasserpflanzen. Beitr. z. Biol. d. Pfl. 28, 145.
- und W. Schenk, 1951: Die Anwendung des Ultrarotabsorptionsschreibers in der Photosyntheseforschung. Ber. dtsh. bot. Ges. 64, 180.
- Franke, W., 1952: Die Wirkung des Vitamin C auf die Atmung von Keimlingen. Planta 41, 197.
- Gassner, G., und G. Goeze, 1954: Assimilationsverhalten, Chlorophyllgehalt und Transpirationsgröße von Getreideblättern mit besonderer Berücksichtigung der Kalium- und Stickstoffernährung. Z. Bot. 27, 257.
- Giroud, A., 1938: L'acide ascorbique dans la cellule et les tissus. Protopl. Monogr. Berlin.
- Goldstein, B. J., und D. V. Volkenson, 1947: Über die Fe-Ascorbinsäure in tierischen Geweben. Biochimija 12, 89. Zitiert nach Metzner (1952).
- Grüss, J., 1927: Die Haustoren der Nymphaeaceen. Ber. dtsh. bot. Ges. 45, 459.
- Hagen, U., 1952: Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen photosynthetischer Leistung, Blattgrün- und Ascorbinsäuregehalt höherer Pflanzen. Diss. München.

238 H. Luger: Einfluß d. Ascorbinsäure a. d. Assimilation u. Atmung höh. Pflanzen

Hausen, S. v., 1956: Die Rolle des Vitamin C beim Wachstum der höheren Pflanzen. *Biochem. Z.* 288, 378.

Holtz, P., und C. Reichel, 1940: Über die gebundene Ascorbinsäure in Pflanzen. *Klin. Wschr.* 461.

Hill, R., 1939: Oxygen produced by isolated chloroplasts. *Proc. Roy. Soc. London B.* 127, 192.

— 1940: Oxygen production by isolated chloroplasts. *Nature* 146, 61.

Klein, G., 1951: *Handbuch der Pflanzenanalyse*. Wien.

Krassnowsky, A. A., und G. P. Brin, 1950: Die Reaktionen der durch Licht reduzierten Form des Chlorophylls. *Ber. Akad. Wiss. UdSSR. N. S.* 73, 1239. Zitiert nach Metzner (1952).

Marthaler, H., 1938: Untersuchungen über den Kohlenhydratgehalt von Alpenpflanzen. *Jb. wiss. Bot.* 87, 267.

Medawara, M. R., 1950: Notizen über Vitamin C in der Pflanze. *Phyton* 2, 195.

Mehler, A. H., 1951: Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch. Bioch. a. Bioph.* 34, 2.

Metzner, H., 1952: Die Reduktion wässriger Silbernitratlösungen durch Chloroplasten und andere Zellbestandteile. *Protoplasma* 41, 129.

Mirimanoff, A., 1938: A propos de la reaction de Molisch. *Rev. gén. de Bot.* 50, 33.

Moldtmann, H. G., 1939/40: Untersuchungen über den Ascorbinsäuregehalt von Pflanzen in seiner Abhängigkeit von inneren und äußeren Faktoren. *Planta* 30, 297.

Moser, E., 1950: Vitamin C in Blättern von Laub- und Nadelbäumen unter Berücksichtigung von Nord- und Südseite. *Diss. München*.

Ondratschek, K., 1940: Vitamine als vermehrungsbegrenzende Faktoren bei *Haematococcus pluvialis*. *Arch. Mikrobiol.* 11, 219.

— 1942: Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. *Arch. Mikrobiol.* 12, 229.

Pirson, A., 1949: Stoffwechsel organischer Verbindungen. *Fortschr. Bot.* 12, 247.

— 1953: Stoffwechsel organischer Verbindungen. *Fortschr. Bot.* 14, 289.

Raadts, E., 1947/48: Über den Einfluß von Ascorbinsäure auf die Auxinaktivierung. *Planta* 36, 105.

Rabinowitch, E. J., 1951: *Photosynthesis*. New York.

Rakshit, S., 1958: Über den Einfluß des Chlorophylls auf die Autoxydation der Ascorbinsäure. *Biochem. Z.* 297, 153.

Seybold, A., und H. Mehner, 1948: Über den Gehalt von Vitamin C in Pflanzen. *Sber. Heidelberger Akad. Wiss.*

Strugger, S., 1949: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie*. 2. Aufl. Berlin.

Tolmach, L. J., 1951: The influence of triphosphopyridinnucleotid and other physiological substances upon oxygen evolution from illuminated chloroplasts. *Arch. Bioch. a. Bioph.* 33, 120.

Vishniac, W., und S. Ochoa, 1951: *Nature* 167, 768. Zitiert nach Pirson (1953).

Watson, S. A., und G. R. Noggle, 1947: *Plant physiology* 22, 228. Zitiert nach H. Burström. *Fortschr. Bot.* 12, 216 (1949).

Warburg, C., 1946: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin.

Weber, F., 1957: Silberreduktion in den Chloroplasten. *Protoplasma* 29, 516.

Wittingham, C. F., 1952: The chemical mechanism of photosynthesis. *Bot. Review* 18, 245.

# Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten

Von

**Dietrich Düvel**

Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik, Hamburg

Mit 17 Textabbildungen

(Eingelangt am 22. April 1954)

## 1. Ermittlung der Grana-Anordnung

Die Struktur der Chloroplasten ist auch heute noch nicht voll geklärt, und sie ist daher Gegenstand vieler Untersuchungen. Es sei hier nur auf wenige Autoren der letzten Jahrzehnte hingewiesen: Zirkle (1926), Heitz (1932, 1936), Wieler (1936), Yuasa (1943), de Rezende-Pinto (1948), Strugger (1951), Heitz und Maly (1953).

In der Fortführung der Untersuchungen über die Granaanordnung in Chloroplasten nach den in W. Mevius und D. Düvel (1953) angegebenen Methoden wurde eine Reihe weiterer Pflanzen näher betrachtet. Die Beobachtung der Plastiden in Profil- und Flächenansicht und die Ausmessung der in Höhenabständen von 0,5 bis 0,5  $\mu$  gemachten photographischen Aufnahmen von Chloroplasten in Flächenstellung erfolgte u. a. bei folgenden höheren Pflanzen:

*Impatiens parviflora*,

*Dracaena deremensis*,

*Aspidistra elatior*,

*Sanchezia nobilis*,

*Dracaena fragrans*,

*Philodendron cuspidatum*,

*Peperomia magnolifolia*,

*Monstera deliciosa*,

*Hoya carnosa*,

*Heteranthera reniformis*,

*Ardisia wallichii*,

*Fittonia argyroneura*,

*Eichhornia azurea*,

*Stellaria media*,

*Saponaria officinalis*,

*Dorstenia contrajerva*,

*Cordyline terminalis*,

*Agapanthus umbellatus*.

Da sich die Bilder im großen und ganzen ähneln, soll hier nur ein Beispiel wiedergegeben werden. Auf den Abb. 1 und 2 ist ein und derselbe

Chloroplast von *Aspidistra elatior* dargestellt. Die Abb. 2 zeigt einen optischen Querschnitt, der ungefähr  $0,5\ \mu$  tiefer liegt als der auf Abb. 1. Die unterschiedliche Lage der Granen auf den beiden Bildern ist zu erkennen.

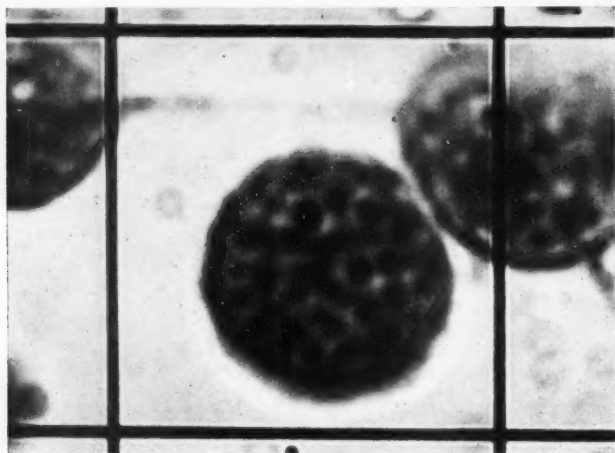


Abb. 1. Lebender Chloroplast von *Aspidistra elatior*.

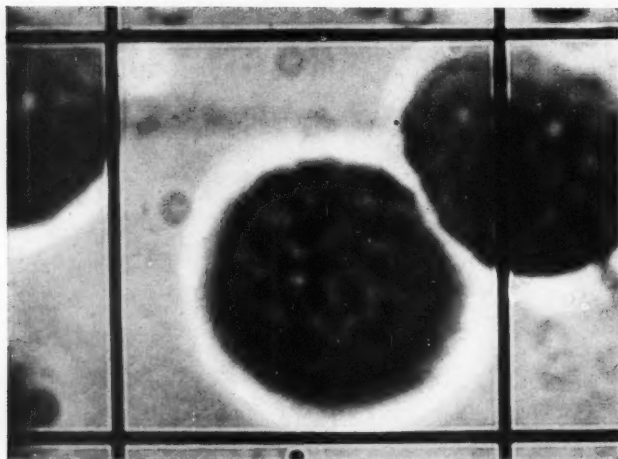


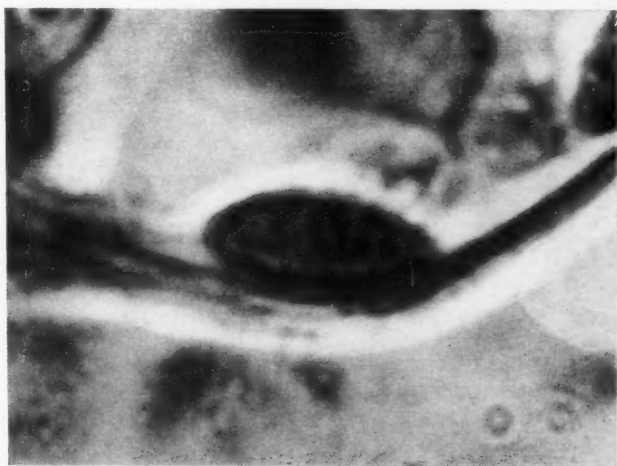
Abb. 2. Derselbe Chloroplast ungefähr  $0,5\ \mu$  tiefer.

Die Meßtabelle bestätigt gewisse Lageveränderungen der Granen innerhalb einer zum Mikroskopisch parallelen Ebene.



## Meßtabelle

	Abbildung 1		Abbildung 2	
Prüfung des Gitterabstandes:				
	$x = 1,0$	$y = 68,0$	$x = 1,0$	$y = 67,9$
	$x = 66,0$	$y = 68,0$	$x = 66,0$	$y = 67,9$
	$y = 1,0$	$x = 67,0$	$y = 1,0$	$x = 66,8$
	$y = 67,0$	$x = 66,9$	$y = 67,0$	$x = 67,0$
Begrenzung des Chloroplasten:				
Links	$x = 14,5$	$y = 25,0$	$x = 15,5$	$y = 25,0$
Rechts	$x = 60,0$	$y = 25,0$	$x = 62,0$	$y = 25,0$
Unten	$x = 35,0$	$y = 4,0$	$x = 35,0$	$y = 4,0$
Oben	$x = 35,0$	$y = 49,5$	$x = 35,0$	$y = 46,5$
Mittelpunkte einiger Granen:				
1.		3.		
$x = 45,0$	$x = 41,0$	$x = 49,5$	$x = 48,0$	
$y = 27,9$	$y = 22,5$	$y = 23,0$	$y = 21,0$	
2.		4.		
$x = 48,5$	$x = 46,0$	$x = 44,5$	$x = 43,5$	
$y = 28,5$	$y = 28,0$	$y = 20,0$	$y = 17,5$	

Abb. 3. Lebender Chloroplast von *Ardisia wallichii* in Profilstellung.

Die Abb. 3 zeigt einen lebenden Chloroplasten von *Ardisia wallichii* in Profilstellung. Die Granasäulen sind in ihrer schrägen Anordnung zu erkennen. Die einzelnen Grana sind jedoch nur andeutungsweise auszumachen.

Aus den Feststellungen ist zu schließen, daß die zueinander weitgehend parallel liegenden Grana nicht genau senkrecht übereinander angeordnet sind.

schichtet sind, sondern daß sie meistens mehr oder weniger stark gegeneinander versetzt erscheinen, so daß sie schief geneigte, gestaffelte Säulen zu bilden scheinen.

## 2. Untersuchungen zur Chloroplastenentwicklung

Die Entwicklung der Plastiden ist seit langem Gegenstand vieler Untersuchungen und lebhafter Diskussionen. Auch hier möge an Stelle einer Schilderung der verschiedenen neuesten Theorien die Nennung einiger Namen genügen: Strugger (1950), de Rezende-Pinto (1952), Heitz und Maly (1955).

Für die eigenen Untersuchungen zur Entwicklung der Chloroplasten wurde *Elodea canadensis* als Hauptobjekt gewählt. Für die Wahl dieser Pflanze waren mehrere Gesichtspunkte maßgebend. Einmal konnte *Elodea canadensis* auch bei der mikroskopischen Untersuchung im gleichen Umweltmedium Wasser verbleiben, zum anderen hat sie wie viele submerse Wasserpflanzen im Normalfall grüne Plastiden in den epidermalen Blattzellen. Weiterhin stand dieses Untersuchungsobjekt in großer Zahl zur Verfügung, und es konnte verhältnismäßig leicht in ausreichender Menge in jeder Jahreszeit gezogen werden.

Wie die Geschichte der Theorien über die Entstehung der Chloroplasten zeigt, sind Fixierung und Färbung entscheidende Faktoren für die Begründung der jeweiligen Anschauungen gewesen. Sie allein gaben oft den Ausschlag für die Beurteilung gewisser Erscheinungen. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen sollte dieser Engpaß möglichst umgangen werden und das Schwergewicht auf die Beobachtung von lebendem Pflanzenmaterial verlagert werden.

Beobachtungen und Aufnahmen erfolgten mit dem Leitz-Objektiv 1/12, Ölimmersion 100fach, und den Apochromaten 100fach und 120fach von Zeiß. Die Untersuchungen im Phasenkontrastverfahren wurden mit der Phasenkontrasteinrichtung von Zeiß-Winkel, Objektiv Ph 90, und mit der Phasenkontrasteinrichtung von Leitz, Objektiv Ph 90, ausgeführt. Als Lichtquelle diente eine Zeiß-Niedervoltlampe 30 Watt oder die Beleuchtungseinrichtung am Panphot (Leitz). Die fluoreszenzoptischen Untersuchungen machte ich mit dem für die Fluoreszenzmikroskopie hergerichteten Panphot (Leitz) sowie zeitweilig mit einer Sonderkonstruktion der Firma Leitz. Als Erregerlichtfilter benutzte ich das Blaufilter BG 12 (Schott) 4 mm und als Sperrfilter die Filter OG 2 und OG 1 von Schott oder das Reichert-Filter 8007. Als Lichtquelle diente bei den Fluoreszenzuntersuchungen eine Gleichstrombogenlampe von 10 bis 12 Ampere. Die Wärmestrahlen und das langwellige Rot wurden durch 2- bis 20prozentige angesäuerte Kupfersulfatlösung in Kuvetten mit einer Schichttiefe von 5 cm absorbiert. Für Arbeiten im oder am Objekt diente der zweiarmlige Mikromanipulator von Zeiß.

Bei den Untersuchungen von *Elodea canadensis* verwendete ich Material, das schon längere Zeit in Glasgefäßen kultiviert wurde, und daneben auch Material, das an verschiedenen Orten im Freien frisch gesammelt worden war. Merkbare Unterschiede gab es bei den beiden Gruppen nicht.

Der Vegetationskegel des Sprosses von *Elodea canadensis* ist auf Grund vieler Untersuchungen in seiner Anatomie und Histologie hinreichend bekannt. Die im Vergleich zu manchen anderen Pflanzen sehr langgestreckte, fast an einen Zuckerhut erinnernde Form des Vegetationskegels erlaubt es verhältnismäßig leicht, einzelne Zonen zu unterscheiden. Zur Beobachtung wurde der Vegetationskegel unter einem binokularen Präpariermikroskop freigelegt. Alle den Vegetationspunkt umhüllenden Blättchen wurden mit feinen Pinzetten oder Scheren entfernt. Hierbei lag der Sproß in entchlortem Leitungswasser oder in 0,1 molarer Glucoselösung. Mittels einer kleinen Pipette wurde gegen den Vegetationskegel ein schwacher Wasserstrom gerichtet, um etwaige Chloroplasten oder Zellfragmente aus zerstörten Zellen abgetrennter Blätter von den vorderen Teilen sorgfältig zu entfernen. Außer bei weiter unten zu beschreibenden Untersuchungen wurde der Vegetationskegel im Gebiete der 10. bis 15. Blattanlage abgetrennt und vorsichtig mit einem Deckgläschen bedeckt. Für den Lebenszustand des Urmeristems und der ersten Blattanlagen hatte diese Abtrennung meist keine unmittelbar störenden Folgen. Da die Zartheit der Urmeristemzellen es nicht erlaubte, dünne Schnitte zu machen (vgl. auch K. L. Noack 1921, Friedrichs 1922, Kaßmann 1926), in denen die Zellen als ungeschädigt anzusprechen seien, wurde der abgetrennte Vegetationskegel betrachtet. Aber auch dabei kam es öfter vor, daß die Urmeristemzellen durch das Freipräparieren geschädigt sein mußten. Wenn auch die Durchsichtigkeit dieses Objektes nicht sehr günstig ist, so waren die äußeren Zellschichten, im besonderen die Tunicazellen, klar zu beobachten. Und dies reichte für den Zweck der durchzuführenden Untersuchung im allgemeinen aus, da ja das erwachsene Blatt in seinen epidermalen Zellen über Chloroplasten verfügte, mußten auch die äußeren Zellen des Vegetationskegels (Dermatogen) schon Chloroplasten oder ihre Vorstufen besitzen.

Im Mikroskop bot das Urmeristem folgendes Bild. Die Tunicazellen der Spitze waren ziemlich isodiametrisch. Die Länge ihrer Wände schwankte von 10 bis 15  $\mu$ . Neu abgegliederte Zellen hatten jedoch eine wesentlich geringere Frontbreite, und ihre Länge entsprach der der ursprünglichen Zelle. In den Zellen waren die Zellkerne, die einen großen Teil der Zelle ausfüllten, unschwer zu erkennen. Im Zytoplasma, das hier noch keine Vakuolen zeigt, war eine Anzahl verschieden großer Einschlüsse wahrzunehmen. Die Gestalt dieser Körperchen war recht unterschiedlich und bei manchen auch nicht ständig gleich. Die meisten hatten Stäbchen-, Spindel- oder Kugelform, ein kleinerer Teil hatte hantelförmige, keulenförmige oder unregelmäßige Gestalt. Die Größe variierte von der Auflösungsgrenze des Mikroskops bis zu 1  $\mu$ . Die größte Anzahl dieser Einschlüsse lag in Kernnähe. Bei der Beobachtung im „weißen“ Licht zeigten einige kugelförmige plasmatische Gebilde eine eben wahrnehmbare grüne Farbe. Nun ist man leicht geneigt, bei pflanzlichem Material diese Farbe mit dem Vorkommen von Chlorophyll zu koppeln. Eingehend durchgeführte vergleichende Untersuchungen dieser kleinen Körperchen im Hellfeld- und im Fluoreszenzverfahren ließen erkennen, daß kein Chlorophyll

vorhanden sein konnte, denn es ließ sich in ihnen keine Rotfluoreszenz nachweisen.

Es könnte sich allem Anschein nach hier um einen rein optischen Effekt handeln. Es ist zulässig (vgl. Dänzer 1948), die in der Kernphysik beim Einfang der Neutronen angewendete Breit-Wigner-Formel auf das Gebiet der Optik zu übertragen. Bei durchsichtigen Körpern, z. B. Glaskugeln, deren Dimensionen in der Größe der Wellenlängen des Lichtes liegen, tritt durch Resonanz bevorzugt eine verstärkte Absorption derjenigen Wellen auf, deren innere Länge im bestimmten ganzen Verhältnis zum Durchmesser der Kugel steht. Aus dem ungefähren Brechungsexponenten und dem Durchmesser läßt sich schließen, daß ab und an von den Plasmaeinschlüssen Wellenlängen aus dem roten Gebiet durch Absorptions- oder Streuprozesse herausgenommen werden. Wurde mit „weißem“ Licht beleuchtet, so könnte es vorkommen, daß die Komplementärfarbe Grün erscheint. Da nun einerseits die „rot“ einfangenden Körperchen am größten sind, somit bei ihnen überhaupt am ehesten noch eine Farbe erkannt werden kann, andererseits das menschliche Auge für Grün große Empfindlichkeit besitzt, ist es vielleicht erklärbar, daß die anderen Farben nicht so sehr in Erscheinung treten. Bei Beleuchtung mit rotem Licht zeigten die entsprechenden Plasmaeinschlüsse stärkeren Kontrast, was zwar auch auf die absorbierende Wirkung des Chlorophylls hinweisen könnte, im blauen Licht hingegen schwächere Kontraste.

Die Korpuszellen des Urmeristems hatten unregelmäßige Gestalt. Soweit erkennbar, waren die inneren Zellverhältnisse denen der Tunicazellen ähnlich. Vor allem galt dies für die außernukleären Plasmaeinschlüsse.

Beim ungefärbten lebenden Präparat konnten im Hellfeld in den Zellen des Urmeristems die Vorstufen der Chloroplasten nicht eindeutig erkannt werden. Auch Vergleiche mit Schnitten, die zum Nachweis kleinerer Stärkeeinschlüsse mit Jod (Jod-Chloralhydrat, Jodjodkalium) gefärbt worden waren, erlaubten nicht mit Sicherheit, im lebenden Material Plastidenvorstufen zu identifizieren.

Im Fluoreszenzmikroskop war in der Zone des Urmeristems keine Rotfluoreszenz zu erkennen. Auch Aufnahmen mit Spektralplatten, die ihr Sensibilitätsmaximum im Bereich des vom Chlorophyll ausgesandten Fluoreszenzlichtes haben, zeigten, daß dort kein fertiges Chlorophyll vorliegt.

Um zu versuchen, Chloroplastenvorstufen von Chondriosomen und Mikrosomen zu unterscheiden, mußte zu Valfärbungen gegriffen werden. Die Vegetationskegel von *Elodea canadensis* wurden eine Stunde lang im Vakuum mit einer Rhodamin-B-Lösung (Strugger 1937, 1950) 1:1000 infiltriert, nachdem ich den Kegel im Gebiet der 10. bis 15. Blattanlage abgetrennt hatte. Die anschließende Untersuchung zeigte aber, daß eine Anfärbung irgendwelcher Zellelemente des Urmeristems nicht stattgefunden hatte. Um nun dem Farbstoff den Zutritt zu den Tunicazellen zu erleichtern, trennte ich den Vegetationskegel ca. 200  $\mu$  von der Spitze entfernt ab. Sodann zerstörte ich vorsichtig mit Hilfe des Mikromanipulators in diesem abgetrennten Stück die meisten Korpuszellen von unten herauf bis in die unmittelbare Nähe der äußeren Zellschicht an der Front des Urmeristems.

Nur eine einfache oder doppelte Schicht von mechanisch nicht zerstörten Zellen blieb übrig. Diese so vorbereiteten Vegetationskegelfragmente wurden dann mit Rhodamin B 1:1000 eine Stunde gefärbt und fünf bis fünfzehn Minuten mit entchlortem Leitungswasser oder 0,15prozentiger Rohrzuckerlösung ausgewaschen. In den Tunicazellen des Urmeristems waren dann einzelne meist rundliche Einschlüsse stärker gefärbt. Im weißen Licht war die Farbe zwar nicht immer klar erkennbar rot, aber bei Benutzung von grünem Licht hoben sie sich kontrastreich dunkel ab und im Fluoreszenzmikroskop leuchteten die Körper gelb auf. Demnach muß das Rhodamin B in ihnen angereichert oder angelagert sein.



10  $\mu$

Abb. 4.

Tunicazellen des Urmeristems von *Elodea canadensis*, mit Rhodamin B gefärbt.

Möglich wäre es allerdings auch, daß der Farbstoff durch Entmischung an einzelnen Punkten konzentriert wurde. Jedoch konnte in einigen Fällen bei der Färbung unter dem Mikroskop mittels Durchsaugens der Rhodaminlösung beobachtet werden, daß einzelne vor der Färbung schon sichtbare farblose Gebilde den Farbstoff in sich anreicherten.

Die durch Rhodamin B gefärbten Zellbestandteile hatten einen Durchmesser von ungefähr  $0,9 \mu$ . In ihrem Inneren ließen sich keine noch stärker angefärbten Bezirke erkennen, sondern der Farbstoff war über den gesamten Körper gleichmäßig verteilt. Trotz variierter Färbezeiten und intensiven Suchens konnte in den Urmeristemzellen kein sphärischer Plasmaeinschluß gefunden werden, der in seinem Inneren eine runde, durch Rhodamin B elektiv färbbare Scheibe enthielt. Die Abb. 4 zeigt Tunicazellen des Urmeristems, die mit Rhodamin B gefärbt wurden. Die einzelnen

Körperchen sind in ihrer Gesamtheit gefärbt und haben meist kugelige oder ovale Gestalt (Pfeile). Eine ungefärbte Zone ist nicht erkennbar.

Auch in den weiter rückwärts liegenden Zellen, dort, wo Urmeristem und Halbmeristem ineinander übergehen, sind in den durch Rhodamin B gefärbten Körperchen keine elektiv hervorgehobenen Strukturen auszumachen. Zellen aus diesem Gebiet von der Oberseite des Vegetationskegels zeigt die Abb. 5. Die gefärbten Einschlüsse sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nach Sorokin (1937) und Drawert (1953) sollen durch Janusgrün B in erster Linie nur Mitochondrien oder Chondriosomen und durch Nilblau-

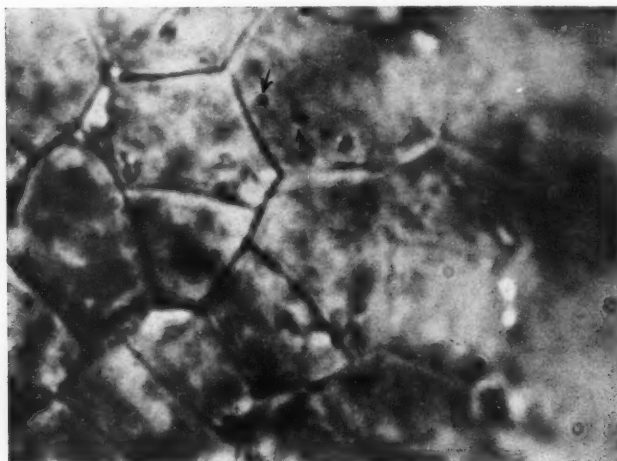


Abb. 5. Epidermale Zellen aus dem Bereich des Übergangs des Urmeristems in das Halbmeristem.

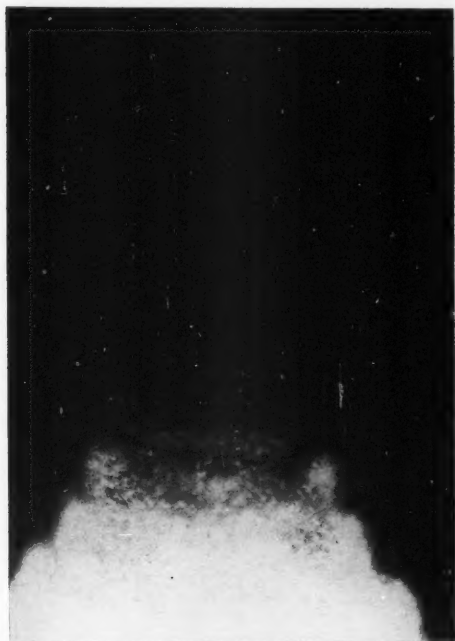
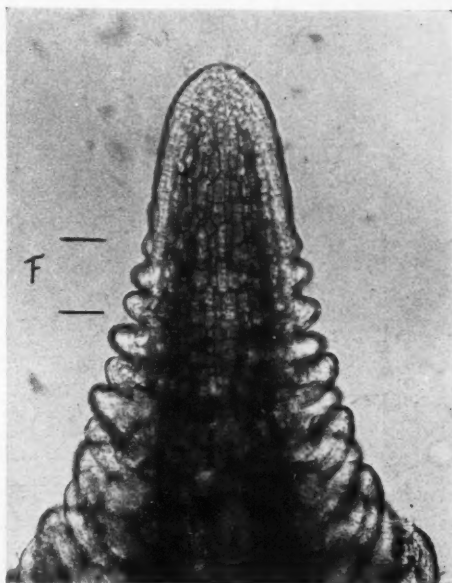
sulfat Mikrosomen vital gefärbt werden. In den mit diesen Farbstoffen durchgeführten Färberversuchen hoffte ich indirekt Plastidenvorstufen zu finden. Die hiermit nicht färbbaren Körperchen holte ich mit dem Mikromanipulator aus der Zelle heraus und untersuchte sie außerhalb des Zellverbandes im Phasenkontrastverfahren. Dabei konnte ich keine Innenstrukturen finden, die einem Primärgranum entsprechen würden.

Da die eindeutige Identifizierung der farblosen Chloroplastenvorstufen in den lebenden embryonalen Zellen nicht einwandfrei zu erreichen und das Primärgranum (Strugger 1950) nicht zu finden war, wollte ich die Chloroplasten dort näher untersuchen, wo sie sich einwandfrei als Plastiden oder unmittelbare Vorstufen zu erkennen gaben. Wie die Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop zeigte, trat die Rotfluoreszenz immer zuerst in einem Bereich auf, der sich von der zweiten bis zur vierten Blattanlage



Abb. 6. Vegetationskegel von *Elodea canadensis*.

erstreckte. Am häufigsten jedoch war die erste Rotfluoreszenz in der dritten Blattanlage zu beobachten. In dieser Zone mußte also der Übergang von farblosen zu chlorophyllhaltigen Plastiden stattfinden. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen denselben Vegetationskegel eines Sprosses von *Elodea canadensis*. Die Abb. 6 wurde im Hellfeld und die Abb. 7 im Fluoreszenzmikroskop gemacht. Auf Abb. 6 erkennt man das Urmeristem und das Halbmeristem, das schon die ersten Interzellularen besitzt,



sowie die höckerartigen Blattprimordien. Ein Vergleich mit der Abb. 7 zeigt, daß im Urmeristem noch keine Rotfluoreszenz vorhanden ist. Erst in der Zone F (Abb. 6) tritt die erste schwache, bei einer Wellenlänge um  $680\text{ m}\mu$  liegende Rotfluoreszenz auf. Diese nimmt dann nach unten hin rasch an Intensität zu.

In der ersten Blattanlage fehlt noch die Rotfluoreszenz. Mit Rhodamin B lassen sich in den eben sich vorwölbenden Zellen sphärische Gebilde anfärben, wenn der innere Teil des Vegetationskegels wie weiter oben be-

Abb. 7. Derselbe Vegetationskegel wie auf Abb. 6 im Fluoreszenzmikroskop.

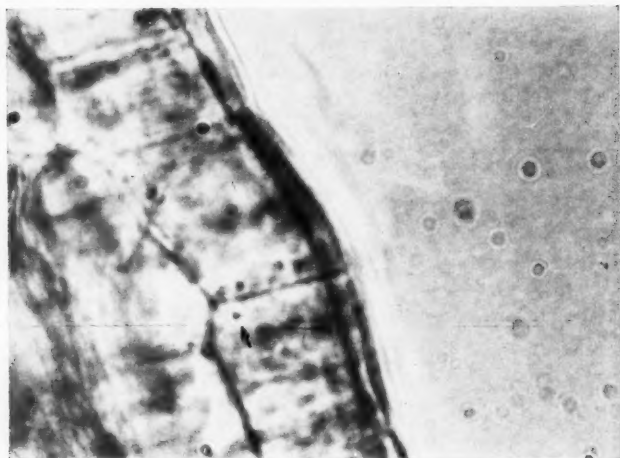


Abb. 8. Tunicazellen der ersten Blattanlage, mit Rhodamin B gefärbt.



Abb. 9. Rot fluoreszierende Plastiden aus der dritten Blattanlage.

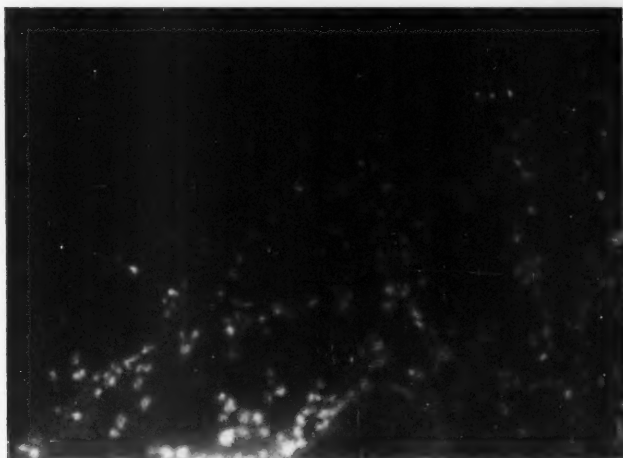
schrieben, zerstört wurde. Die Größe der Teilchen liegt um  $0,7$  und  $0,9 \mu$ . Auf der Abb. 8 sind die Tunicazellen der ersten Blattanlage zu erkennen. Beiderseits der Mittelwand liegen zwei kugelige Körper, die in ihrer Färbung völlig homogen erscheinen (Pfeil).

Gleiche Größe wie diese hier und in der zweiten Blattanlage mit Rhodamin B anfärbbaren Körperchen zeigen die in der dritten Blattanlage rot fluoreszierenden Plastiden. Die Rotfluoreszenz ist bei ihnen über ihren gesamten Bereich verteilt und nicht in einem Scheibchen, Primärgranum, lokalisiert, das von einem nicht fluoreszierenden Stroma umgeben wird. Die Abb. 9 zeigt solche Plastiden aus der dritten Blattanlage.



10  $\mu$

Abb. 10. Chloroplast in der dritten Blattanlage des Vegetationskegels.



10  $\mu$

Abb. 11. Fluoreszierende Plastiden aus der vierten Blattanlage.

Die Rotfluoreszenz ist sehr schwach und nur schwierig photographisch festzuhalten. Man erkennt aber bei den scharf eingestellten Plastiden (Pfeile), daß die Fluoreszenz über den gesamten Bereich gleichmäßig verteilt ist.

Diese fluoreszierenden Plastiden wurden mit dem Mikromanipulator aus der Zelle herausgebracht und in die Umgebung des Vegetationskegels,

der für diese Untersuchungen in 0,2 molarer Rohrzuckerlösung lag, abgedrängt. Nur bei den isoliert für sich liegenden Plastiden war es möglich, mit dem Phasenkontrastmikroskop einigermaßen zu definierende Bilder zu bekommen. Im Zellverband des Vegetationskegels sind für das Phasenkontrastverfahren die optischen Verhältnisse so kompliziert und verwirrend, daß eine klare Trennung wirklich vorhandener Strukturen von optischen Erscheinungen kaum möglich ist. Nach Wolter (1950) leistet

das Phasenkontrastmikroskop bei schmalen, dünnen Objekten sehr gute Dienste. Bei dünnen, aber breiten Objekten hingegen werden Strukturen sichtbar, die nur im Verfahren und nicht im Objekt begründet liegen. Diese isolierten Plastiden zeigten ein fast den gesamten Körper einnehmendes dunkles Feld, das von einem winzigen hellen Hof umgeben wird. Mit Sicherheit läßt sich dieser Hof nicht als Plastidenmembran ansprechen.

Wie im Fluoreszenzmikroskop, so zeigen auch im normalen Hellfeldmikroskop die ersten chlorophyllhaltigen Stadien der Chloroplasten keine deutliche Differenzierung in Grana und Stroma. So zeigt die Abb. 10 die dritte Blattanlage im Vegetationskegel von *Elo-dea canadensis*. In der Spitzenzelle ist ein Chloroplast scharf eingestellt, dessen



10  $\mu$

Abb. 12. Fluoreszierende Plastiden in den Zellen der vierten Blattanlage.

Durchmesser ungefähr  $1 \mu$  beträgt. Das Chlorophyll ist gleichmäßig in ihm verteilt.

In den nächstälteren Blattanlagen wird die Rotfluoreszenz allmählich stärker und deutlicher, und einzelne leuchtende Körperchen scheinen etwas an Größe zu gewinnen. Die Abb. 11 gibt Zellen einer vierten Blattanlage im Fluoreszenzlicht wieder. Die stärkere Rotfluoreszenz ist zu erkennen.

Die über den gesamten Plastiden gleichmäßig verteilte Fluoreszenz ist auch auf der Abb. 12 gut wahrzunehmen. Es sind Plastiden aus der vierten Blattanlage wiedergegeben. Die Aufnahme wurde stärker nachvergrößert.

In der fünften und sechsten Blattanlage ist nun eine Beobachtung zu machen, die sich vereinzelt auch schon in der vierten wahrnehmen ließ. Das Chlorophyll, das in den ersten sichtbaren Stadien gleichmäßig über den gesamten Plastiden verteilt ist, scheint hier in der fünften und sechsten Blattanlage eine Änderung seiner Verteilung zu erfahren.

Denn nun gab es Plastiden, die nicht mehr einheitlich, sondern in einzelnen Gebieten wesentlich stärker fluoreszierten. Meistens waren es zwei Areale, die jedes für sich ähnliche Größe hatten wie die in der dritten Blattanlage zuerst fluoreszierenden Plastiden. Der Pfeil auf Abb. 13 deutet

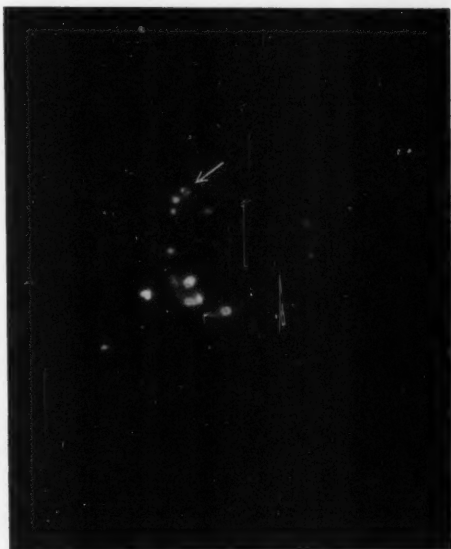


Abb. 13. Fluoreszierende Plastiden aus der fünften Blattanlage.

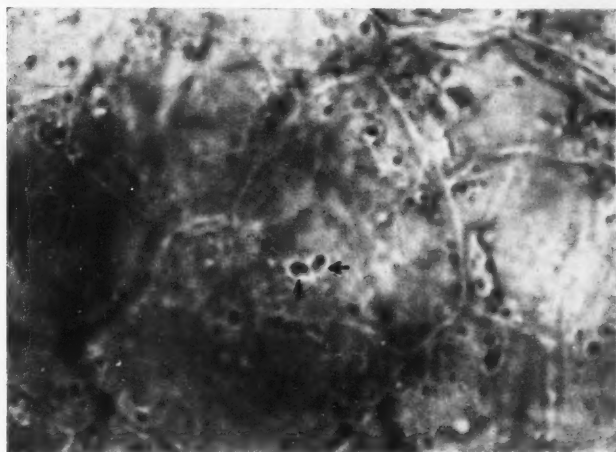


Abb. 14. Chloroplasten aus der fünften Blattanlage. In rotem Licht photographiert.

auf einen Chloroplasten, bei dem das Chlorophyll in zwei Gebiete aufgeteilt ist. Die Rotfluoreszenz ist dort deutlich intensiver als in der dunklen Zwischenzone. Die stark leuchtenden Bezirke liegen manchmal nahe beieinander, in anderen Fällen sind sie mehr oder weniger weit voneinander entfernt.

Auch im Hellfeldmikroskop ist, wenn auch schwierig, die Aufteilung des Chlorophylls festzustellen. Zur Kontrasterhöhung diente ein Rotfilter (Schott R G 5). Die Abb. 14 zeigt Zellen der fünften Blattanlage. Bei den scharf eingestellten, durch Pfeile markierten Chloroplasten kann man gerade eben wahrnehmen, daß in ihnen das Chlorophyll nicht mehr gleich-

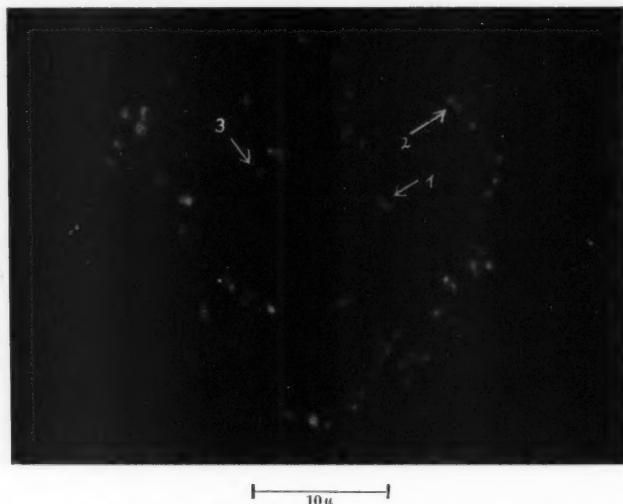


Abb. 15. Fluoreszierende Plastiden aus der sechsten Blattanlage.

mäßig verteilt ist. Eine Entscheidung, ob die Mittelzone völlig pigmentfrei ist, kann hierbei nicht getroffen werden.

In der sechsten Blattanlage ist die Rotfluoreszenz der Plastiden schon recht stark. Die meisten Plastiden haben an Größe zugenommen und das Chlorophyll ist in ihnen aufgeteilt, so daß hell leuchtende Gebiete mit dunklen abwechseln. Bei Pfeil 1 auf Abb. 15 ist ein Chloroplast wiedergegeben, bei dem das Chlorophyll in zwei Polen konzentriert zu liegen scheint. Pfeil 2 zeigt auf einen Plastiden, bei dem diese Erscheinung deutlicher hervortritt. Bei anderen Chloroplasten jedoch (so bei Pfeil 3) fluoresziert das Pigment schon in mehreren kleinen Arealen. Dazwischen liegen dunkle Zonen.

Zu den Beobachtungen von lebenden, aber abgetrennten Vegetationskegeln sollte die Dauerbeobachtung von Vegetationskegeln treten, die am Sproß verbleiben. Als Kulturgefäß während der Beobachtung diente ein Glasbehälter, den ich durch Aufkleben eines 12 mm hohen Glasringes mit



einem Durchmesser von 6 cm auf eine planparallele dünne Glasplatte erhalten hatte. Dieses Becken wurde mit entchlortem Leitungswasser oder einer vierfach verdünnten Knopschen Nährlösung beschickt. Ein 8–12 cm langer Sproß von *Elodea canadensis* wurde hineingelegt und der Vegetationskegel vorsichtig durch Entfernen oder Zurückbiegen der störenden Blättchen freipräpariert. Mittels einer kleinen Glasöse wurde die Sproßspitze festgehalten, so daß horizontales und vertikales Ausweichen weitgehend verhindert war. Bis auf die Halterung durch diese Glasöse lag der Sproß vollkommen frei im Beobachtungsgefäß. Die Beobachtung erfolgte mit dem Wasserimmersionsobjektiv (Leitz 90fach). Beim Ausleuchten des Objekts wurde nach Möglichkeit das Köhlersche Prinzip verwirklicht. Ich senkte das Objektiv in das Wasser der Ringschale und näherte es vorsichtig dem Vegetationskegel, bis das Bild der zu untersuchenden Zellgruppe scharf erschien. Diese Untersuchungsweise erlaubte eine Beobachtung des Vegetationskegels, ohne daß er zwischen Deckglas und Objektträger eingeeengt war. Das Kulturwasser wurde alle acht Stunden erneuert, um etwaiges Wachstum von Mikroorganismen möglichst zu unterbinden und um die Ansammlung von Stoffwechselprodukten oder anderen Stoffen, die durch Blattwunden austreten konnten, zu unterdrücken. Auf ein Verschließen der Blattwunden mit Wachs oder Paraffin wurde verzichtet, da dabei leicht mechanische Schädigungen hervorgerufen werden konnten und zudem ein völliger Abschluß aller Wunden kaum möglich war.

Die Lebenduntersuchung der Zellen des nicht abgetrennten Vegetationskegels in Dauerbeobachtung ist experimentell sehr schwierig. Trotz vieler Versuche war es nicht möglich, länger als drei Tage zu beobachten. Entweder waren dann die beobachteten Zellen ihrem Aussehen nach nicht mehr als ungeschädigt anzusprechen, oder aber ältere Blattanlagen schoben sich zwischen Objektiv und Zelle oder störten sonst die Beobachtung.

Die Tunicazellen des Urmeristems ließen bei der Hellfelduntersuchung neben dem Zellkern eine Reihe kleinerer Plasmaeinschlüsse auf Grund ihrer unterschiedlichen Brechungsindizes erkennen. Außer einigen kugligen bis ellipsoiden Körperchen mit Größen von 0,8 bis 1,1  $\mu$  war die Masse der plasmatischen Gebilde im Zytoplasma kleiner. Mit Rhodamin B war auch bei 24stündigem Anfärben in der Dunkelheit keine Vitalfärbung zu erzielen.

Im Fluoreszenzmikroskop war im Urmeristem und in den ersten zwei Blattanlagen keine Rotfluoreszenz zu erkennen. Erst im Gebiet der dritten und vierten Blattanlage trat Rotfluoreszenz auf. Bei der Vitalbeobachtung war es also nur dort möglich, mit Sicherheit die Plastiden schon zu erkennen. Wiederum waren die ersten fluoreszierenden Plastiden im ganzen gleichmäßig leuchtend. In ihrem Innern war kein besonders deutlich rot leuchtender Bezirk auszumachen.

Die fluoreszierenden Plastiden waren 0,8 bis 1  $\mu$  groß. Sie boten das gleiche Bild, wie es auf den Abb. 11 und 12 dargestellt ist. Obwohl ich im Gebiet der zweiten und dritten Blattanlage viele Dauerbeobachtungen durchführte, die sich bis zu drei Tagen ausdehnten, konnte ich den direkten Übergang eines farblosen Plasmaeinschlusses zum chlorophyllhaltigen rot-

fluoreszierenden Plastiden nicht beobachten. Dabei blieben die Zellen sowohl tags wie nachts nicht länger als vier Stunden ohne Beobachtung.

Im Bereich der fünften Blattanlage wollte ich versuchen, die bei den Untersuchungen abgetrennter Vegetationskegel gefundenen Chlorophyllverteilungen in den Plastiden länger zu beobachten. Die Dauerbeobachtung einzelner Zellorganellen in den Zellen der fünften Blattanlage war durch eine merkliche Plasmabewegung und somit Verlagerung der Plasmaeinschlüsse gestört. Ein Plastid, dessen Beobachtung für zwei bis drei Stunden unterbrochen wurde, war nicht mit Sicherheit wiederzufinden. Eine ununterbrochene Betrachtung der Zellen war aus technischen Gründen nicht möglich, außerdem ließ die Empfindlichkeit der Augen bei längeren Unter-



— 10  $\mu$  —

Abb. 16. Fluoreszierende Plastiden aus der fünften Blattanlage.

suchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop sehr stark nach. Zudem schien auch der lange Einfall hoher Lichtintensitäten die Zellen des sonst durch viele Blätter geschützten Vegetationskegels mit der Zeit sehr zu beeinträchtigen. Bei eintägigen Dauerbeobachtungen, die nur durch kleine Pausen unterbrochen wurden, konnte jedoch folgendes beobachtet werden:

Wie die Abb. 15 schon zeigte, ist in der fünften Blattanlage eine Reihe von Plastiden vorhanden, die nicht mehr gleichmäßig auf der gesamten Fläche fluoreszieren, sondern hell leuchtende Zentren neben dunkleren Zonen besitzen. Die zwei Zentren, in denen das Chlorophyll nach Ausweis der Fluoreszenz vorlag, entfernten sich voneinander, indem die nichtleuchtende Brücke zwischen ihnen allmählich größer zu werden schien. Die Einzelgröße der fluoreszierenden Bezirke betrug im allgemeinen 0,8 und 0,9  $\mu$ , war also den Durchmessern der zuerst fluoreszierenden gesamten Plastiden der dritten Blattanlage mehr oder weniger gleich. Die Entfernung zwischen

den fluoreszierenden Körperchen wuchs im Laufe von zehn Stunden auf  $0,9$  bis  $1,3 \mu$  an. Dann trennten sich die chlorophyllführenden Bezirke ganz voneinander und wurden zwei selbständige Körperchen. Auf der Abb. 16 sind mehrere Plastiden in verschiedenen Stadien zur gleichen Zeit zufällig nebeneinander vorhanden. Pfeil 1 deutet auf einen Plastiden, dessen Chlorophyll erst kaum aufgeteilt ist. Bei Pfeil 2 liegt ein Plastid, bei dem zwischen den nicht gleichmäßig stark fluoreszierenden Bezirken schon deutlich eine dunkle Zone erkennbar ist. Bei Pfeil 3 ist die nicht leuchtende Brücke ebenso groß wie der Durchmesser der leuchtenden Bezirke.

Ich erhoffte, nun auch Dauerbeobachtungen der Chlorophyllaufteilung innerhalb eines Plastiden, ohne daß eine Teilung des ganzen Plastiden folgte, durchführen zu können. Wie die Abb. 15 zeigte, gibt es in der sechsten Blattanlage vereinzelt Plastiden, deren Fluoreszenz schon in mehrere Areale aufgeteilt erscheint. Im Gebiet der fünften und sechsten Blattanlage war der Aufteilungsvorgang zur Hauptsache also zu suchen. Es gelang mir trotz zahlreicher Versuche nicht, den Mechanismus der

Chlorophyllaufteilung in einem Plastiden zu verfolgen. Wie die Aufteilung und die Bildung von Granasäulen vor sich geht, konnte ich weder in der sechsten noch in den nächsten Blattanlagen *in vivo* beobachten.

Eine Dauerbeobachtung ist in den nächst älteren Blattanlagen kaum mehr durchzuführen, da starkes Streckungswachstum der Zellen und Blättchen immer mehr hindert. Jedoch ist festzustellen, daß die Zahl der fluoreszierenden Bezirke, die Zahl der Grana also, sich vergrößert. Gleichzeitig wird die farblose Stromasubstanz immer mehr und deutlicher sichtbar. In kleinen, etwa  $0,6$  mm langen Blättchen ist die Differenzierung in Stroma und Grana schon so deutlich, daß sie sich ohne allzu große Schwierigkeiten photographisch festlegen läßt. Die Abb. 17 zeigt solche Chloroplasten. Die Granadurchmesser liegen im allgemeinen zwischen  $0,7$  und  $0,9 \mu$ .

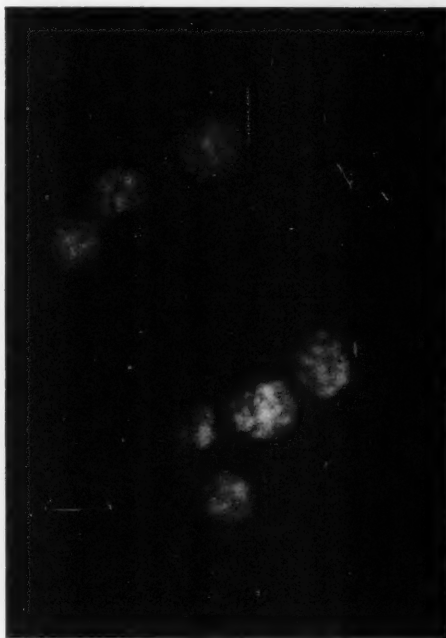


Abb. 17. Fluoreszierende Chloroplasten aus einem  $0,6$  mm langen *Elodea*-Blatt.

### Diskussion zur Entwicklung der Chloroplasten

Aus den Untersuchungen des Vegetationskegels von *Elodea canadensis* ist über die Entstehung und Entwicklung der Chloroplasten noch kein endgültiges Bild zu geben.

Es war nicht möglich, bei der Vitalbeobachtung inmitten der sonstigen Plasmaeinschlüsse einwandfrei die ersten Frühstadien der Chloroplasten als solche zu erkennen und zu verfolgen. Wenn auch mit Rhodamin B Körperchen im Plasma zu färben sind, die in Größe und Gestalt den ersten chlorophyllhaltigen Plastiden ähnlich sind, so ist doch der exakte Beweis eines Überganges färbbarer Plasmaeinschlüsse in fluoreszierende Plastiden nicht erbracht worden. Das Schwergewicht der Beurteilung der Frühstadien in lebenden Meristemen lag also auf der Beobachtung eben ergrünter Plastiden. Hierbei wurde von dem sehr empfindlichen Nachweis von kleinen Mengen Chlorophyll durch Fluoreszenz weitgehend Gebrauch gemacht. Die zuerst fluoreszierenden kugelhähnlichen Plastiden trugen das Chlorophyll gleichmäßig in sich verteilt und hatten Durchmesser, die denen der Grana in erwachsenen Chloroplasten ähnlich waren. Das Vorhandensein einer nur allein fluoreszierenden Scheibe in ihrem Innern konnte nicht festgestellt werden. Auch bei meinen Untersuchungen an *Impatiens parviflora*, bei denen durch Eisenmangel eine Hemmung der Chloroplastenausbildung erzeugt wurde, war der zuerst Chlorophyll führende Körper nicht scheibenförmig, sondern kugelartig. Doch ist dabei zu erwähnen, daß es fraglich ist, ob der durch Mangelfaktoren gehemmte Chloroplast den gleichen Entwicklungsgang nimmt wie derjenige in normalen meristematischen Geweben.

Es ist sehr schwierig, aus den bei *Elodea canadensis* gemachten Beobachtungen eine klare Darstellung der Chloroplastenentwicklung zu folgern. Daher soll nur versucht werden, eine Deutung für die festgestellten Erscheinungen zu geben, die nicht den Anspruch erhebt, unbedingt dem wirklichen Entwicklungsverlauf gleich zu sein. Der zuerst fluoreszierende Plastid könnte neben geringen Mengen Membran- und Stromasubstanz zur Hauptsache nur aus chlorophyllführender Substanz bestehen, wobei diese mit Granasubstanz wohl gleichzusetzen ist. Nach vorherigem Größerwerden wird diese aufgeteilt und durch Stromasubstanz getrennt, die durch „interkalares“ Wachstum (s. a. Kolkwitz 1899) an Masse zunimmt und die Grana auseinanderdrängt. Dieser Vorgang, der besonders in der fünften und sechsten Blattanlage zu beobachten war, scheint also eine zahlenmäßige Vermehrung der Plastiden darzustellen, die sich schon früh einschaltet.

Das Auftreten mehrerer fluoreszierender Bezirke im jungen Plastiden könnte durch ungleichmäßige Verteilung der chlorophyllführenden Substanz innerhalb des an Masse ebenfalls zunehmenden Stroma erklärt werden. Ungleichmäßig deshalb, weil die Größe der Bezirke und die Intensität der Fluoreszenz häufig nicht gleich sind. Ebenso sind auch die Grana erwachsener Chloroplasten nicht alle untereinander gleich. Dabei scheinen auch diese zahlreicheren Areale zuerst noch kugelartige Gestalt zu besitzen. Die Entstehung der Granasäulen könnte dann vielleicht wie folgt erklärt werden:

Innerhalb der chlorophyllführenden Substanz beginnen submikroskopische „Stromaschichten“ an Dicke zuzunehmen, wobei sie erstere in Scheiben aufspalten, die wiederum selbst auch einen Zuwachs erfahren. Diese Scheiben, die Grana, sind im erwachsenen Chloroplasten dann zu mehr oder weniger deutlichen Säulen geordnet. Wenn der Ausdruck Primärgranum angewendet werden soll, dann müßte, den Beobachtungen an *Elodea canadensis* nach, damit der ganze kugelhähnliche Komplex bezeichnet werden, der in seiner Gesamtheit nach Ausweis der Fluoreszenz zuerst das Chlorophyll enthält.

### Zusammenfassung

1. Die Grana in den erwachsenen Chloroplasten höherer Pflanzen sind in mehr oder weniger schräg stehenden Säulen angeordnet. Dies Bauprinzip wurde bei mehreren höheren Pflanzen durch Fotografieren und Messungen bestätigt.

2. Bei der Vitalbeobachtung von Meristemen konnten farblose Proplastiden nicht mit Sicherheit als solche erkannt und verfolgt werden.

3. Im Vegetationskegel von *Elodea canadensis* ist in den Plastiden aus dem Gebiet der dritten Blattanlage zuerst Chlorophyll nachweisbar.

4. Das Vorhandensein eines scheibenförmigen Primärgranums in den jüngsten Chloroplastenstadien konnte nicht festgestellt werden.

5. In der fünften und sechsten Blattanlage von *Elodea canadensis* ist eine Vermehrung der Plastiden zu beobachten. Die Aufteilung des Chlorophylls beginnt vereinzelt schon in der vierten, meist in der fünften und sechsten Blattanlage. Der Mechanismus der Aufteilung konnte noch nicht geklärt werden.

### Zitierte Literatur

- Dänzer, H., 1948: Einführung in die Theoretische Kernphysik, Karlsruhe.  
 Drawert, H., 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. Bot. Ges. 66, 134.  
 Friedrichs, G., 1922: Die Entstehung der Chromatophoren aus Chondriosomen bei *Helodea canadensis*. Jahrb. wiss. Bot. 61, 430.  
 Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromocentren. Planta 18, 571.  
 — 1936 a: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. Ber. dtsch. Bot. Ges. 54, 362.  
 — 1936 b: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. Planta 26, 134.  
 — und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforschung 8 b, 243.  
 Kassmann, F., 1926: Die Entwicklung der Chondriosomen und Chloroplasten von *Cabomba aquatica* und *Cabomba caroliniana* auf Grund von Dauerbeobachtungen an lebenden Zellen. Planta 1, 624.  
 Kolkwitz, R., 1899: Die Wachstumsgeschichte der Chlorophyllbänder von *Spirogyra*. Bot. Unters. Sonderabdruck Festschrift Schwendener.  
 Mevius, W. sen., und D. Düvel, 1953: Die Grana-Anordnung in Chloroplasten. Protoplasma 42, 287.  
 Noack, K. L., 1921: Untersuchungen über die Individualität der Plastiden bei Phanerogamen. Z. Bot. 13, 1.

- 258 D. Düvel: Beiträge z. Kenntnis d. Struktur u. Entwicklung d. Chloroplasten  
de Rezende-Pinto, M. C., 1948 a: Sur la structure hélicoidale des chloroplastes.  
Port. Acta Biol. 2, 111.  
— 1948 b: Sur la structure granulaire des chloroplastes d'*Anthoceros*. Port. Acta  
Biol. 2, 115.  
— 1952: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren  
Pflanzen. Protoplasma 41, 536.  
Sorokin, H., 1937: Mitochondria and plastids in living cells of *Allium cepa*. Amer.  
J. Bot. 25, 28.  
Strugger, S., 1937 a: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhoda-  
minen. Flora 131, 115.  
— 1937 b: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhoda-  
minen. Flora 131, 324.  
— 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturwiss. 37, 166.  
— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsh. Bot. Ges. 64, 69.  
Wieler, A., 1936: Über den Bau der Chlorophyllkörner. Protoplasma 26, 295.  
Wolter, H., 1950: Zur Deutung von Beobachtungen mit dem Phasenkontrastver-  
fahren. Naturwiss. 37, 272.  
Yuasa, A., 1945: On the "green spirals" of the chloroplast. Bot. Mag. Tokyo 58,  
53.  
Zirkle, C., 1926: The structure of the chloroplasts in certain higher plants. Amer.  
J. Bot. 13, 301.



## Some Micellar Components of *Physarum polycephalum* as Revealed by the Electron Microscope

By

O. L. Sponsler<sup>1</sup> and Jean D. Bath<sup>2</sup>

Department of Botany  
University of California, Los Angeles

With 8 Figures

(Received April 30, 1954)

Some of the micellar components of *Physarum polycephalum*, a myxomycete which has long served science as a classic material for protoplasmic study, can now be revealed by means of the electron microscope. Unlike some of the other plant protoplasts which have been studied so far, this material shows the presence of sub-microscopic fibrillae, in addition to the numerous particulate morphological entities reported earlier (Sponsler and Bath 1953) and discussed here in more detail.

The *Physarum polycephalum* used in this study was grown on oatmeal agar at a pH of about 6. Under these conditions it forms a network (Seifriz 1936) the strands of which are a light yellow color (Seifriz and Zetzmann 1935). The veins of this plasmodial network consist of a gelled outer portion (Lewis 1942) and a fluid streaming inner portion. At the advancing border of the plasmodium the outer relatively hyaline region is semi-fluid. The fluid inner portion contains numerous ovoid nuclei, small vacuoles, pigment granules and myriads of fine granules extending in size down into the submicroscopic region (Moore 1933). The microscopic appearance of this material has been well-described elsewhere (Camp 1937, Lewis 1942, Chambers 1943, Moore 1933, Cowdry 1918, Seifriz 1936).

In preparing the samples for study with the electron microscope the following simple procedure was used. A small fragment of active plasmodium was taken up on the tip of a needle, preferably from a portion which had grown up off of the agar on to the glass of the culture vessel.

<sup>1</sup> Deceased March 14, 1953.

<sup>2</sup> Also in the Dept. of Biophysics, School of Medicine.

or better still a portion hanging suspended in the vessel. This small bit of plasmodium was next gently dispersed in either a droplet of water or of physiological saline. This served to suspend the microscopic granules as well as the submicroscopic components of the protoplasm. This suspension was allowed to stand for several minutes in contact with a parlodion-coated electron microscope screen. The excess material was then removed, and the sample was dried prior to study with the Electron Microscope<sup>3</sup> (R. C. A. Type E. M. U.).

It is obvious that a procedure such as this destroys the overall protoplasmic organization (Cohn 1942), but it seems to leave relatively intact the micellar components, and it was these to which our attention was directed.

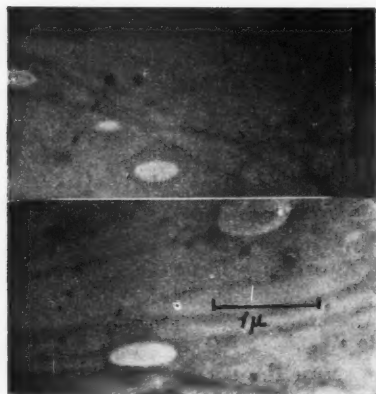


Fig. 1. Submicroscopic fibrillae from *Physarum polycephalum* plasmodium. Total magnification is equal to 17,000 $\times$ .

In the other plant protoplasmic materials which we had studied so far no evidence of fibrillar units had been found, although these had been postulated earlier by various workers on the basis of certain physical properties of protoplasm (Frey-Wyssling 1938, Seifriz 1936). We did, however, observe fibrous sub-microscopic components in the *Physarum polycephalum* material. A representative sample of these fibrillae is shown in Fig. 1. In general these fibrillae ranged around 500–600 Å in diameter. They appeared to be of indefinite length.

Concerning their chemical composition nothing is known as yet. It is possible that these fibrillae are to be related to the actomyosin-like proteins recently extracted from *Physarum polycephalum* (Loewy 1952). Polysaccharides are known to be present in the slime mould plasmodium, and with Ruthenium Red the presence of a pectin-like core can be demonstrated in the plasmodial track; hence the fibrillae might be (1) polysaccharide (2) protein or (3) a polysaccharide-protein complex. (Although nucleoproteins or lipoproteins are by no means to be excluded.) Further electron microscope studies in conjunction with microchemical techniques would be useful to ascertain their chemical nature. It would also be interesting to know whether these fibrillae were originally associated with the outer gelled region or the inner fluid region of the protoplasm, or perhaps both; or perhaps are to be related to the extraneous mucoid material which marks the track of the receding plasmodium (Chambers 1943).

<sup>3</sup> We are indebted to Mr. Henry Froula, College of Engineering at the University of California, Los Angeles, for the maintenance of this instrument.

Studies of fixed and sectioned plasmodial material would be useful in answering this question.

As in other types of plant protoplasts the predominant micellar components are particulate in nature, ranging in size from microscopically-visible particles to those at the molecular-micellar borderline, with the very minute particles being most numerous. As in other plant protoplasts the micellar particles include a great variety of morphological entities (Sponsler and Bath 1953). A few representative types are shown in the following figures.

Certain of the largest particles were of considerable interest to us, particularly because of their internal structure. These often appeared to

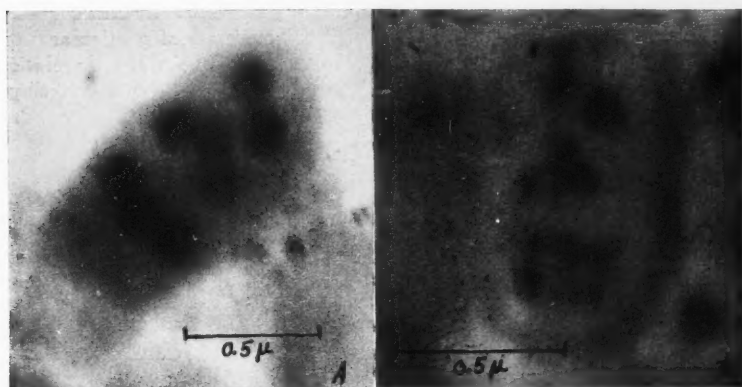


Fig. 2. (a) Particle with dense bodies in its interior. Total magnification, 42,000  $\times$ ; (b) Similar particle. Magnification, 54,000  $\times$ .

have heavily-scattering particles of uniform size within them, arranged in somewhat regular array as shown in Fig. 2a. The dark bodies in Fig. 2a are about 1500 Å in diameter. The notion at once suggested itself to us that these darker bodies within the particle matrix probably contained ribo-nucleic acid which has a high density of 1.65 g./cc. (Astbury 1947). The regular array of these particles is somewhat suggestive of self-reproducing particles. Fig. 2b, unfortunately a poor electron micrograph, is introduced merely to show what might be fission of these heavily-scattering bodies. On the basis of the observations and considerations just mentioned the hypothesis was made that these might be the "plasma-genes" postulated earlier (Sonneborn 1949).

Microchemical electron microscope studies were made in an effort to ascertain the chemical nature of the heavily-scattering small particles as well as the particle matrix. Suspension of the plasmodial material in xylol prior to study with the electron microscope gave large vacuolated particles indicating the presence of lipids in the particle matrix. Attempts

with ribonuclease were made to test whether the small dark interior particles contained ribonucleic acid. Results here were inconclusive, however, possibly because the enzyme, ribonuclease, was not able to penetrate sufficiently into the particle interior.

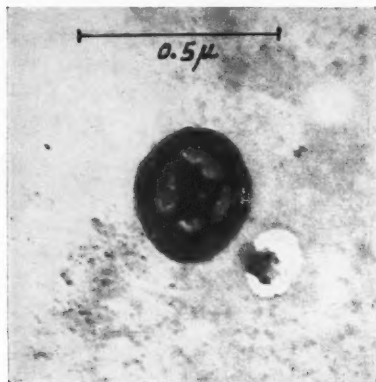


Fig. 3. Submicroscopic particle with internal chambers. Magnification, 63,600  $\times$ .

Another type of particle which was of considerable interest was the type represented in Fig. 5. Here the particle appears to have separate locules in its interior as well as an outer cortical region. Some of the partition in the outer cortical region are only 100–200 Å in thickness. The inner locules are of particular interest because of their possible relationship to the "reaction chambers" postulated earlier (Warburg 1913). During the past twenty years since it became possible to obtain such particles "in vitro" (Bensley and Hoerr (1934) biochemists (Schneider 1953) have associated many

respiratory mechanisms with them. With the advent of the electron microscope it is now beginning to be possible to provide the framework both

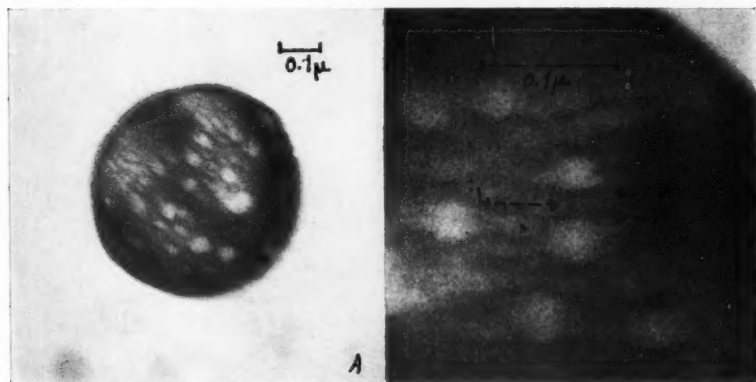


Fig. 4. Particle giving appearance of a spongy net; (a) Magnification, 63,600  $\times$ ; (b) Magnification, 212,000  $\times$ .

micellar (Palade 1953, Sjöstrand 1953, Sponsler and Bath 1953) and molecular (Sponsler and Bath 1942, Sponsler and Bath in press) with which to associate these mechanisms.

Still another version of this type of particle may be seen in Fig. 4a. Here instead of fairly well-defined locules the particle appears to contain minute compartments which give it the appearance when desiccated of a spongy net. The walls of these compartments resemble to a certain extent the "internal cristae" or partial partitions described by other workers (Palade 1953) for fixed and sectioned mitochondria. Fig. 4b is an enlargement of a portion of the particle shown in Fig. 4a. The area indicated by the letters in the figure is comparable to the double membranes described by other workers (Palade 1953, Sjöstrand 1953). The dark outer bands, each of 50 Å in thickness, are interpreted as being protein in nature. The lighter inner portion, interpreted as being lipid, is about 100 Å in thickness in the area under consideration, thus making the total thickness in this area about 200 Å. This interpretation is based on the relative densities of protein (1.3 g./cc.) and lipid (0.9 g./cc.).



Fig. 5. Crescent-shaped submicroscopic particle with interior chambers. Magnification, 96,750  $\times$ .

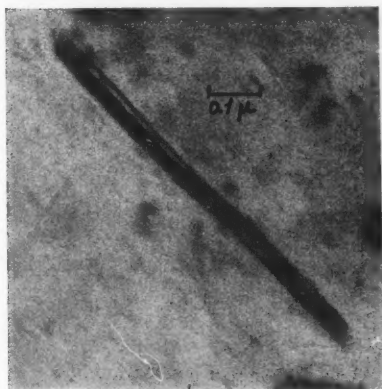


Fig. 6. Linear particle. Magnification, 83,000  $\times$ .

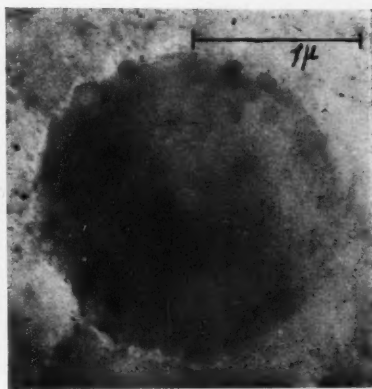


Fig. 7. Large particle containing many smaller particles. Magnification, 26,280  $\times$ .

A shape variation of this type of structure is seen in the crescent particle in Fig. 5. It is often not possible at this preliminary stage in the investigation of the various forms of submicroscopic particles to say

whether a form is a different type of structure or a different developmental stage of one particular type. Such a form as seen in Fig. 5 might be similar to the crescent-shaped degenerative mitochondria reported by certain workers (Harmon 1953).

Although many of the particles appear to be spheroidal in shape, occasionally rod-like particles are found. Fig. 6 shows one of these found in a mass of plasmodium in what might best be described as a presclerotial stage of activity. There appears to be linear alternation of light and dark portions. The dark portions are 50 Å across, and the intermediate lighter portions are 100 Å across. The total dark-light-dark-light-dark pattern is 350 Å across.

Other particles as in Fig. 7 appear to be aggregates of various smaller particles, either of the same size or of different sizes.

An unusual type of structure is that seen in Fig. 8. This particular particle was found in a plasmodium which was in a presclerotial stage,

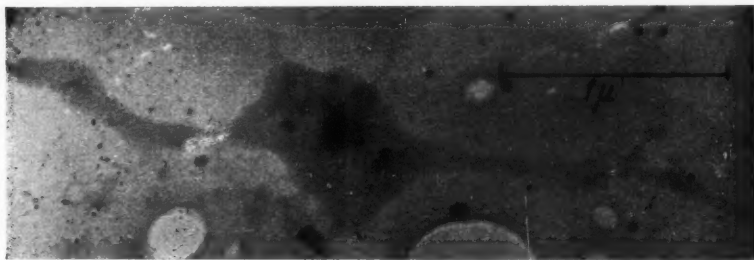


Fig. 8. Intermediate form between particle and fibril. Magnification, 27,040  $\times$ .

although somewhat similar particles were observed in more active plasmodia. The figure shows a particle body with fibrillar portions extending outward away from the body. The fibrillar portions are around 1000 Å in cross section. The dark particle in the interior of the particle body is about 1400 Å in diameter. The structure shown in the figure seems to be intermediate in nature between a particle and a fibril, and it is possible that it represents a stage in either particle or fibril development.

As we observe these dried remnants of protoplasmic entities we should probably realize that in the living protoplasm, if we could but observe them, we would find that just as with the visible mitochondria they would at times exhibit great physical activity and at other times appear to be at rest. Observing them for longer periods of time we might find them to develop from one morphological form to another. All of these changes in form on a micellar level undoubtedly reflect concomitant changes on a molecular level.

On viewing the structures described here we cannot help but feel that the electron microscope is providing the visual-minded biologist with a tool



which is potentially as revealing as the light microscope has been in Cytology during the past one hundred years or so. With this new tool the micellar range of structure has opened up far more rapidly than had been dreamed possible twenty years ago. Many questions remain, however; not the least among them are: (1) how are these morphological entities with their specific organizations synthesized (2) are there various stages of particle development (3) what is their role in the evolutionary scheme of things or how have they evolved (4) what is their relation to latent viruses etc. (5) what are their electrical properties and what kinds of organized patterns do they form with one another in the hydrated living protoplasm?

This latter point brings up one of the most interesting approaches to the reality of living material. After all, the particles that we view in the electron microscope are mostly space and a rather special array of the fundamental units of matter, protons, electrons and neutrons. Rough computations show that even in a very minute particle only 100 Å in diameter we are observing a structure, which, if we were to approximate reality in our thinking, should be thought of as consisting of perhaps several hundred thousand such entities organized in a special way to give the form which we perceive.

#### Literature

- Astbury, W. T., 1947: Symposia of the Soc. for Exp. Biol. Nucleic Acid, No. 1, p. 66, Cambridge.
- Bensley, R. R., and N. Hoerr, 1954: Anat. Rec. 60, 449.
- Camp, W. G., 1937: Bull. Torrey Bot. Club. 64, 307.
- Chambers, R., 1943: Biol. Symp. X, 91.
- Cohn, A. L., 1942: Growth 6, 3, 259.
- Cowdry, N. H., 1918: Biol. Bull. 35, 71.
- Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives, New York.
- Harmon, J. W., 1953: J. Hist. a. Cytochem. 1, 4, 269.
- Lewis, W. H., 1942: The Structure of Protoplasm. Monograph of the Society of Plant Physiologists. 163, Iowa State College Press. Ed. by W. Seifriz.
- Loewy, A. G., 1952: J. cellul. a. comp. Physiol. 40, 1, 127.
- Moore, A. R., 1935: Science Reports of Tohoku Imperial Univ. 8, 189.
- Palade, G. E., 1953: J. Hist. a. Cytochem. 1, 4, 188.
- Schneider, W. C., 1953: J. Hist. a. Cytochem. 1, 4, 212.
- Seifriz, W., 1936: Protoplasm, New York.
- and M. Zetzmann, 1935: Protoplasma 25, 115.
- Sjöstrand, F., 1953: Nature 171, 30.
- Sonneborn, T. M., 1949: American Scientist 37, 33.
- Sponsler, O. L., and Jean D. Bath, 1953: Protoplasma 42, 69.
- 1952: J. cellul. a. comp. Physiol., in press.
- 1942: Symposium of the American Society of Plant Physiologists on the Structure of Protoplasm. 41, ed. by Wm. Seifriz.
- Warburg, O., 1915: Über die Wirkung der Struktur auf chemische Vorgänge in Zellen, Jena.

### Kurze Mitteilung

## Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von *Buxus sempervirens*

Von

Assunta Flasch und Helmut Kinzel

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 22. Januar 1954)

Allbekannt und viel bearbeitet sind die schönen Entmischungskugeln, die in vielen pflanzlichen Zellsäften bei der Speicherung basischer Farbstoffe auftreten. Es seien nur die Namen Pfeffer (1886), Guilliermond (1902), Gicklhorn (1929), Weber (1930) und Härtel (1953) genannt. Im übrigen sei auf die ausführliche Besprechung bei Küster 1951: 508 ff. verwiesen. — Ein anderes Phänomen, das mit dem erstgenannten rein äußerlich eine gewisse Ähnlichkeit aufweisen kann, ist die Synärese von Vakuolen bei Vitalfärbung (Weber 1934), die in einer Scheidung des Vakuoleninhaltes in eine feste und eine flüssige Phase besteht (Hofmeister 1940). Sehr ähnliche Vorgänge lassen sich auch durch Behandlung entsprechend kolloidhaltiger Vakuolen, so von *Cerinthe*-Blütenzellen, mit Säuren hervorrufen (Kenda und Weber 1952, Weber und Kenda 1952, Härtel 1952).

In diesen Komplex von Erscheinungen sind auch die hier wiedergegebenen Beobachtungen zu stellen, wenn sie auch mit keinem der aus der Literatur bekannten Vorgänge völlig identisch zu sein scheinen. Es handelt sich um Beobachtungen, die an den Epidermiszellen der Blattunterseite von *Buxus sempervirens* bei Einwirkung starker Salzlösungen und bei Vitalfärbung gemacht wurden.

Da sich die Vorgänge in vitalgefärbten Zellen genauer und besser beobachten lassen, stellen wir die Versuche mit neutralrotgefärbten Schnitten an den Beginn.

Flächenschnitte der Blattunterseite werden in einer Neutralrotlösung 1:10.000 in Wiener Leitungswasser (pH 7,7) 10 Minuten gefärbt. Die Epidermiszellen zeigen ausgesprochen violettrote Färbung der Vakuolen. Auffallend sind die vor allem in den Schließzellen der Spaltöffnungen befindlichen Öltropfen, die als helle Kugeln gegen den gefärbten Zellsaft stark abstechen.

Der Schnitt wird nun in einer 2 mol  $\text{KNO}_3$ -Lösung vorplasmolysiert und in eine 2 mol  $\text{KCNS}$ -Lösung übertragen. Im Normalfall, d. h. in den meisten Zellen läßt sich nun folgendes beobachten: Zuerst tritt rasche Degeneration des Plasmas ein, da das Kaliumrhodanid die stärkste quellende Wirkung auf die Plasmakolloide entfaltet (Strugger 1932). Nur die rot gefärbte, vom Tonoplasten umhüllte Vakuole bleibt erhalten. Nach einiger Zeit (ungefähr 2 Minuten) platzt auch der Tonoplast, ein Teil des Farbstoffes tritt aus, der Rest der Vakuole aber schrumpft unter merkwürdigen, ruckartigen Bewegungen rasch zusammen und ein rotgefärbter, kugelig fester Körper (meist in Einzahl, manchmal auch in Mehrzahl) bleibt zurück (Abb. 1<sup>1</sup>). Einige Zellen verhalten sich jedoch anders, und es

lassen sich zwei atypische Fälle beobachten:

a) Es kann vorkommen, daß schon vor dem Platzen des Tonoplasten sich ein rotgefärbter Entmischungskörper innerhalb einer schwach gefärbten wäßrigen Phase bildet.

Diese Erscheinung erinnert etwas an die Synärese (Weber 1934), da sich der Entmischungskörper vom Rand der Vakuole her langsam unter Austritt von wäßriger Flüssigkeit zurückzieht. Beim endlichen, völligen Platzen des Tonoplasten schrumpft dann dieser Körper unter Hin- und Herbewegungen weiter zusammen. Es kann sich auch eine Vielzahl von Entmischungstropfen in der Vakuole bilden, aber seltener.

b) Es kommt auch vor, daß sich die schwach gefärbte wäßrige Phase in Form von Tropfen aus dem Vakuoleninhalt ausscheidet und von der stark gefärbten Phase umschlossen wird. Dann tritt beim Platzen des Tonoplasten auch die schwach gefärbte Flüssigkeit ins Freie, und die stark gefärbte Phase verfestigt sich und bleibt zurück.

Zur Kontrolle wurden gefärbte Schnitte auch mit 2 mol  $\text{CaCl}_2$  und 2 mol  $\text{KNO}_3$  plasmolysiert. Dabei zeigt sich in vielen Zellen starke Plasmolyse, nur selten kommt es zu Entmischungen. Die merkwürdigen festen Rückstände konnten hier natürlich nicht beobachtet werden, weil es ja bei den anderen Salzen nicht zur Degeneration des Plasmas kommt.

Der beschriebene Vorgang tritt übrigens nicht nur an gefärbten, sondern auch an ungefärbten Zellen auf. Der ganze Vorgang vollzieht sich aber hier bedeutend langsamer. Wird ein ungefärbter Schnitt der Blattunterseite mit einer 2 mol  $\text{KNO}_3$ -Lösung vorplasmolysiert und darauf in eine 4 mol  $\text{KCNS}$ -

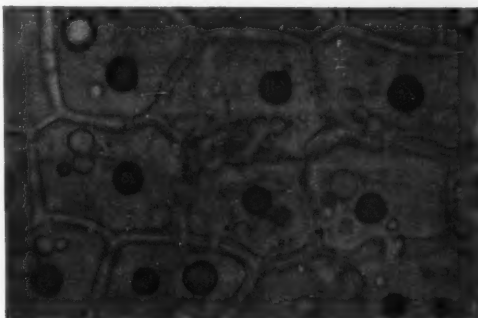


Abb. 1. Epidermis der Blattunterseite von *Buxus sempervirens*. Endstadium nach Vitalfärbung und nachfolgender Behandlung mit 2 Mol  $\text{KCNS}$ . Proto-plasten tot. Feste, rotgefärbte Entmischungskugeln sind zurückgeblieben.

<sup>1</sup> Für die Herstellung der Photographie sei Herrn Dr. W. Url herzlich gedankt.

Lösung übertragen, dann zieht sich der Zellinhalt rasch weiter zusammen und rundet sich besser. Es tritt Kappenplasmolyse mit Übergang zur Tonoplastenplasmolyse ein. Nach etwa 10 Sekunden ist in vielen Zellen das Plasma bereits verquollen, nur der Tonoplast bleibt erhalten. Nach 45 Sekunden zeigt sich in einzelnen Vakuolen eine körnige Struktur (feine Entmischung?) und Tröpfchenbildung. Wenn eine Vakuole mit körniger Struktur platzt, löst sich die Struktur oft auf und es bleibt kein Rest erhalten. In anderen Fällen wird unmittelbar innerhalb des Tonoplasten eine zu diesem parallel verlaufende neue Phasengrenzfläche sichtbar, die sich langsam ins Innere der Vakuole zurückzieht, so daß eine einheitliche neue Entmischungsphase entsteht, die zuerst die Umrisse des Tonoplasten besitzt und sich im Verlauf der weiteren Kontraktion abrundet, wobei etwa vorher in der Vakuole vorhandene Tröpfchenniederschläge verschwinden. — Schließlich platzt der Tonoplast, die Entmischungskugel dehnt sich im ersten Augenblick etwas aus und schrumpft dann auf ein noch kleineres Volumen als vorher ein, wobei sie ein runzeliges Aussehen annimmt. Es kommt auch vor, daß die entstehenden Körper Hohlräume zu enthalten scheinen. Nach ungefähr 12 Minuten ist der Vorgang in allen Zellen beendet. Er dauert hier trotz höherer Molarität der Salzlösung fast doppelt so lang als in vitalgefärbten Zellen.

Zum Vergleich wurden auch Schnitte in Akridinorange pH 8,0 gefärbt, mit 2 mol KCNS plasmolysiert und sowohl im Hellfeld- als auch im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In den Zellen ließen sich nun die gleichen Vorgänge mit den verschiedenen Variationen wie in den mit Neutralrot gefärbten Schnitten beobachten, nur zeigen die meist grün fluoreszierenden Vakuolen bei der Degeneration des Tonoplasten einen Farbumschlag nach Rot und hinterlassen schön rot fluoreszierende Kugeln.

Daß die Vakuole der Epidermiszellen von *Buxus sempervirens* an winterlichem Material außerordentlich reich an Inhaltsstoffen ist, beweist schon der hohe osmotische Wert. (Mit 2 mol TRBZ-Lösung wird sehr schwache Plasmolyse, die beinahe noch als Grenzplasmolyse zu werten ist, erhalten.) Weiters geht die Tatsache aus dem färberischen Verhalten hervor. Mit Neutralrot färben sich die Zellsäfte wie die meisten vollen Zellsäfte (Höfler 1949, Wiesner 1951) violett; ein ähnlicher Farbton tritt übrigens auch bei Färbung mit Rhodamin B auf. So starke Metachromasie mit Rhodamin B ist auch unter vollen Zellsäften nur selten. (Der allgemeine Fall bei Rhodaminfärbung an vollen Zellsäften ist entweder diffuse Rotfärbung oder Ausfällung.) Interessant ist auch die Fluoreszenz der rhodamingefärbten Schnitte. Sie zeigt im Gegensatz zu der gewöhnlichen gelben Rhodaminfluoreszenz einen sonst ungewohnten rötlichen Ton.

Bei der Einengung eines so substanzreichen Zellsaftes können Entmischungsvorgänge nicht überraschen. Solche treten hier auch an ungefärbten Zellen ein, was sonst seltener der Fall sein dürfte. Neu und vorläufig unerklärlich ist die Verfestigung des Entmischungskörpers beim Platzen des Tonoplasten, also gerade in dem Augenblick, in dem für die im Zellsaft enthaltenen Stoffe die Möglichkeit zur Abdiffusion hergestellt wird und am ehesten eine Auflösung der Entmischungskörper zu erwarten wäre.

Noch eine Besonderheit zeigen die Epidermiszellen bei Färbung mit Akridinorange. Nach 15 Minuten Färbezeit in einer Farblösung von pH 8,0 (1 : 10.000) zeigen die Zellen im Hellfeldmikroskop die bekannte blaßgelbe

diffuse Vakuolenfärbung. In einigen Zellen jedoch läßt sich ein netzförmiger oder rundlicher, unbestimmt begrenzter Körper von zartfädiger Struktur, der rotorange angefärbt ist, beobachten (Abb. 2)<sup>2</sup>. Der Zellsaft dieser betreffenden Zellen ist farblos oder schwächer gefärbt als der der übrigen Zellen. — Im Fluoreszenzmikroskop zeigen die diffus gefärbten Zellen grüne, einige auch rote Fluoreszenz. (Die Ursache der Buntfärbung an diesem Objekt ist noch ungeklärt.) Die im Hellfeld rot gefärbten Körper zeigen jedoch intensive grellgelbe Fluoreszenz. In jeder Zelle erscheint der ungefärbte Zellkern im UV-Licht als schwarzes „Loch“.

Diese gelb fluoreszierenden Gebilde in den Zellen sind keine postmortale Erscheinung, die Zellen lassen sich nämlich mit 2 mol Traubenzuckerlösung plasmolysieren. Bei Behandlung dieser Zellen mit 2 mol KCNS werden die gelb fluoreszierenden Körper plötzlich dunkelrot.

Diese im Hellfeld rotorange erscheinenden netz- oder sternförmigen Gebilde sind vermutlich auf Inhaltsstoffe in der Vakuole zurückzuführen und werden bei der Färbung erst einige Zeit nach der Diffusfärbung der Vakuolen sichtbar.

Solche Gelbfluoreszenz bei Färbung mit Akridinorange ist schon von mehreren Autoren beobachtet worden. Höfler und Pecksieder (1947) sahen sie als Übergang zwischen grüner und roter Zellwandfärbung bei Behandlung von Pilzzellwänden mit Akridinorangelösungen gestuften pH-Wertes. Höfler (1947) beschrieb bei gewissen Nekrotestadien von Mooszellen sowie an geschädigten Wundrandzellen in der Außenepidermis von *Allium cepa* Gelbfluoreszenz des Zellsaftes mit Akridinorange. Härtel (1951) sah bei *Pirola* grellgelb fluoreszierende Membranen. Kinzel (1953) beobachtete an Wattfasern solche Gelbfärbung als Übergang zwischen der Grünfärbung in stark sauren bzw. salzhaltigen Lösungen und der Rotfärbung in neutralen bzw. schwach salzhaltigen Lösungen.

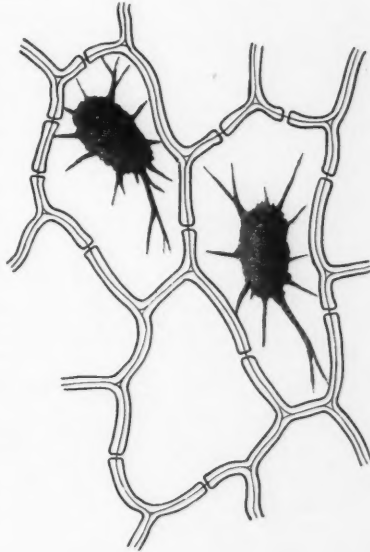


Abb. 2. Epidermis der Blattunterseite von *Buxus sempervirens* nach längerer Färbung mit Akridinorange. Eigenartig geformte, im Hellfeld rotorange gefärbte, im UV-Licht grellgelb fluoreszierende Körper.

<sup>2</sup> Die Häufigkeit des Vorkommens sowie auch die Form der Körper variieren recht stark. (Die Abb. gibt einen der beobachteten Fälle wieder.) Stets sind sie aber im Fluoreszenzmikroskop, auch bei schwacher Vergrößerung, an ihrem intensiven gelben Leuchten kenntlich.

In der vorliegenden Arbeit dürfte neben den von Höfler 1947 beobachteten Erscheinungen erstmalig eine solche Gelbfluoreszenz mit Akridinorange an Zellbestandteilen, die innerhalb des Protoplasten liegen, beschrieben worden sein. Während die Deutung der Rot- und Grünmetachromasie in vielen Fällen geklärt ist, ist die Deutung der gelben Fluoreszenzfarben, zumindest soweit sie nicht als Übergang zwischen Grün und Rot auftreten, noch nicht völlig überblickbar.

### Zusammenfassung

Die Zellen der unteren Blattepidermis von *Buxus sempervirens* zeigen bei Behandlung mit starken (2–4 mol) KCNS-Lösungen nicht bloß die bekannten Erscheinungen der Kappen- und Tonoplastenplasmolyse, sondern es treten verschiedene Entmischungen in der Vakuole auf, und schließlich bleibt nach dem Platzen des Tonoplasten ein kugelig, fester Körper in der Zelle als Rückstand liegen. Besser lassen sich diese Vorgänge an vitalgefärbten Zellen beobachten. Der Entmischungskörper behält in diesem Falle den größten Teil des vorher von der Vakuole gespeicherten Farbstoffes in sich eingeschlossen.

Bei Färbung der Zellen mit Akridinorange pH 8,0, 1 : 10.000, kommt es zunächst zur gewohnten Diffusfärbung, nach etwa 15 Minuten Färbezeit tritt jedoch in manchen Zellen ein rotorange gefärbtes netzartiges oder rundliches Gebilde auf, das im Fluoreszenzmikroskop grellgelb fluoresziert.

### Literatur

- Gicklhorn, J., 1929: Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung. Kolloidchem. Beih. 28, 367.
- Guilliermond, A., 1902: Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. Lyon.
- Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. Protoplasma 40, 338.
- 1952: Das Verhalten des „festen Zellsaftes“ von *Cerinthe* bei Fluorochromierung mit Akridinorange. Protoplasma 42, 85.
- 1953: Fluoreszenzmikroskopische und mikrochemische Beobachtungen an *Cirsium arvense*. Mikroskopie 8, 41.
- Höfler, K., 1947: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 585.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis 19, 90.
- und E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Österr. Bot. Z. 94, 99.
- Hofmeister, L., 1940: Mikrurgische Studien an Borraginoideen-Zellen. Protoplasma 35, 65.
- Kenda, G., und F. Weber, 1952: Rasche Vakuolenkontraktion in *Cerinthe*-Blütenzellen. Protoplasma 41, 458.
- Kinzel, H., 1953: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma 42, 209.
- Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. Jena. S. 508 ff.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2, 179.



Rasche Bildung v. Entmischungskörpern in Zellsäften v. *Buxus sempervirens* 271

Strugger, S., 1932: Über Plasmolyse mit Kaliumrhodanid. Ber. dtsh. bot. Ges. 50, 24.

Weber, F., 1930: Vakuolenkontraktion, Tropfenbildung und Aggregation in Stomatazellen. Protoplasma 9, 128.

— 1934: Vakuolenkontraktion der Boraginaceen-Blütenzellen als Synärese. Protoplasma 22, 4.

— und G. Kenda, 1932: Zweimalige Vakuolenkontraktion in *Cerinthe*-Zellen. Phytion 4, 315.

Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma 40, 405.

## Referate

**Lambertz, Peter: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden.** Mit 28 Textabbildungen. *Planta* 44, 147—190 (1954).

Verf. bestätigt frühere Beobachtungen von Schumacher und Halbsguth über das Vorkommen freier, durch die Zellwand an die Oberfläche ziehender, plasmatischer Protuberanzen und weist ihre weite Verbreitung innerhalb der Angiospermen nach. Die Darstellung solcher Außenwandplasmodesmen gelingt nur nach Fixierung nach Gilson, wobei dem Hg-Zusatz entscheidende Bedeutung zukommt; es wird ein optimal wirkendes Fixiergemisch angegeben, bei dem die Essigsäure der normalen Gilson-Lösung durch Holzessig und Formalin ersetzt ist. Zur Färbung eignet sich schwefelsaures Pyoktanin. Wesentlich ist, daß frische und unverletzte Organe fixiert werden, an nachträglich fixierten Schnitten sind Plasmodesmen in den Außenwänden auch nach vorheriger Tiefkühlung nicht darstellbar. Die Plasmodesmen erscheinen als bogen- oder parabelförmige Plasmastrukturen, deren Scheitel die Kutikula berühren, während die Enden oft pinselartig zerfranst mit dem Zellinnern zusammenhängen; oft sind in der Aufsicht zwei Mündungen in der Kutikularebene zu beobachten. Jeder Ast dieser bogenförmigen Strukturen besteht wieder aus zwei feinen, parallel laufenden Fäden, ähnlich den Chromatiden eines Chromosoms. — Die früher beobachtete Launenhaftigkeit des Auftretens von Außenwandplasmodesmen erklärt sich daraus, daß sie nicht beständig sind, sondern je nach Witterung, Tageszeit und Zustand des Blattes verschieden zahlreich auftreten. Durch Verdunkeln verschwinden sie reversibel, während sie sich beim Vergilben des Blattes endgültig zurückziehen. Auch bei der Plasmolyse werden die Plasmafortsätze abgerissen oder aus den Kanälen herausgezogen; sie sind offenbar für das Festhaften des Protoplasten an der Zellwand verantwortlich. Die bei der Zerreißung sich bildenden Fadenstrukturen sind wahrscheinlich mit den Hechtschen Fäden identisch. — Die vom Verf. beschriebenen und durch ausgezeichnete Mikrophotographien dargestellten Plasmodesmen sind denen, die zwei Zellen miteinander verbinden, homolog und Verf. trägt daher keine Bedenken, auch die Plasmastrukturen der Außenwände mit dem gleichen Ausdruck zu belegen. (Ganz ähnliche Strukturen finden sich übrigens auch in den an Interzellularen grenzenden Zellwänden.) Es liegt auf der Hand, daß die Außenwandplasmodesmen von besonderer Bedeutung für die Stoffaufnahme und -abgabe (es sei hier nur an die wandständigen Lipoide Hansteen-Cranners erinnert), für die Kutikulartranspiration sowie für die Reizphysiologie sein müssen.

O. Härtel (Graz).

Kurze Mitteilung

- Flasch, Assunta, und H. Kinzel: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von *Buzus sempervirens* . . . . . 266

Referat . . . . . 273

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

- Scheidt, W.: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum* . . . . . 23. 12. 1953
- Kopetzky-Rechperg, O.: Beobachtungen an Etoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus* (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß . . . . . 7. 5. 1954
- Linser, H.: Die Wachstumswirksamkeit von  $\beta$ -Naphthoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen . . . . . 13. 5. 1954
- Grave, Gisela: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* . . . . . 22. 5. 1954
- Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Some Features of *Nitella* Chloroplasts as Revealed by the Electron Microscope . . . . . 14. 6. 1954
- Stosch, H. A. v.: Eine Kammer für mikroskopische Lebenduntersuchungen mit Trennung von Objekt und strömendem Medium . . . . . 3. 5. 1954
- Rieth, A., und H. A. v. Stosch: Der Kapillarheber, ein Bauelement zur Herstellung von Durchströmungspräparaten . . . . . 3. 5. 1954
- Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Numerical Aspects of Protein Molecules in *Escherichia coli* . . . . . 5. 5. 1954
- Drawert, E.: Über die Eignung zelleigener Anthocyane zur pH-Wert-Bestimmung des Zellsaftes . . . . . 7. 5. 1954
- Nagai, S.: The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, Particularly by Chloroplasts . . . . . 24. 6. 1954
- Bierling, R.: Zur Bedeutung der lokalen Mitochondriendichte für die Formkonstanz von Zellen . . . . . 25. 6. 1954
- Lettré, H., und Annelies Schleich: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen . . . . . 30. 6. 1954
- Ziegler, Magda: Untersuchungen über Wundreizreaktionen an Pflanzen . . . . . 10. 7. 1954
- Wiede, M., und F. Meyer: Über die Toxizität einiger Fluorochrome . . . . . 26. 7. 1954
- Ziegenspeck, H.: Das Vorkommen von Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen . . . . . 16. 8. 1954
- Weber, F.: Virus-Kristalle in *Lilium* . . . . . 12. 9. 1954
- Weber, F.: „Elaioplasten“ fehlen den Schließzellen von *Hosta plantaginea* . . . . . 15. 9. 1954
- Weber, F.: „Sterinoplasten“ fehlen den Schließzellen . . . . . 18. 9. 1954
- Mayr, H. H.: Zur Kenntnis des osmotischen Verhaltens von Getreidewurzeln . . . . . 30. 9. 1954
- de Rezende-Pinto, M., und A. de Lemos Pereira: Über die Struktur der Chloroplasten von *Oedogonium* . . . . . 7. 10. 1954
- Heilbrunn, L. V., and W. L. Wilson: The Initiation of Cell Division in the *Chaetopterus* Egg . . . . . 28. 10. 1954

Springer-Verlag in Wien

*Soeben erschienen:*

# Enzymologie

Eine Darstellung für Chemiker, Biologen und Mediziner

Von

**Otto Hoffmann-Ostenhof**

Dr. phil., Privatdozent am I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

Mit 44 Textabbildungen. XVI, 772 Seiten. 1954

Ganzleinen S 670.—, DM 112.—, \$ 26.05, sfr. 114.60

Das vorliegende Werk ist im wesentlichen eine erweiterte Ausarbeitung einer bereits mehrmals gehaltenen zweisemestrigen Vorlesung über Enzymologie für fortgeschrittene Hörer der Chemie. Die Ergänzungen betreffen vor allem eine sehr ausführliche Zitierung der Originalliteratur sowie solcher Teile, welche das Buch für Biologen und Mediziner wertvoller machen sollen. Die gewählte Darstellung setzt eine gewisse Vorbildung voraus, dürfte aber dem im Titel genannten Leserkreis ohne weiteres verständlich sein.

Im ersten Teil des Buches wird die allgemeine Enzymologie abgehandelt; es folgt dann die Besprechung der einzelnen Enzyme unter besonderer Betonung der Vielfalt enzymkatalysierter Vorgänge und zum Abschluß eine kurze Darstellung des Zusammenwirkens der Enzyme im Intermediärstoffwechsel. In allen Teilen des Buches wird versucht, die biologische Bedeutung der berichteten Tatsachen herauszuarbeiten. Bei der speziellen Behandlung der einzelnen Enzyme wird auch oft auf eine etwaige technische Verwendung Bezug genommen. Die Methodik wird soweit behandelt, daß der Leser eine Vorstellung darüber erhält, wie die berichteten Ergebnisse erarbeitet wurden.

Der Verfasser bedient sich einer von ihm selbst ausgearbeiteten und bereits in der Fachliteratur veröffentlichten Systematik und Nomenklatur der Enzyme, die rationeller und konsequenter ist als die bisherige Übung. Der Grund für diese Neuerung ist die wohl allgemeine Lehrerfahrung, wie sehr eine konsequente und deskriptive Nomenklatur dem Studenten das Eindringen in ein Gebiet erleichtert. Damit aber der Leser die volle Möglichkeit rascher Orientierung in der gesamten übrigen Literatur erhält, wird den neugeprägten Enzymbezeichnungen stets der traditionelle Name in Klammer und Kursivschrift beigelegt. Als weitere Neuerung wird in der Darstellung konsequent der wohl unbestrittenen Tatsache Rechnung getragen, daß Enzyme gleicher Spezifität, die aus den verschiedenen Organismenarten stammen, als chemisch voneinander verschiedene Stoffe anzusehen sind.

Die Fachliteratur wurde bis zum Ende des Jahres 1953 berücksichtigt, so daß das Werk weitgehend den neuesten Stand der Forschung darstellt.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

